

THESIS / THÈSE

DOCTEUR EN SCIENCES

Le flagelle de *Brucella melitensis*: caractérisation de la structure et de la régulation flagellaire

Ferooz, Jonathan

Award date:
2009

Awarding institution:
Université de Namur

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

**Le flagelle de *Brucella melitensis* : caractérisation de la
structure et de la régulation flagellaire**

Dissertation présentée par
Jonathan Ferooz
en vue de l'obtention du grade
de Docteur en Sciences

Composition du jury :

Prof. Jean-Jacques Letesson (Promoteur, FUNDP, Namur)

Dr Pierre Cornelis (VUB, Bruxelles)

Prof. Jean-Yves Matroule (FUNDP, Namur)

Prof. Carine Michiels (FUNDP, Namur)

Dr Michel Zygmunt (INRA, Tours, France)

© Auto-édité par [Jonathan Ferooz](#)
Juillet 2009
B - 5000 Namur (Belgique)

Toute reproduction d'un extrait quelconque de ce livre,
hors des limites restrictives prévues par la loi,
par quelque procédé que ce soit, et notamment par photocopie ou scanner,
est strictement interdite pour tous pays.

Imprimé en Belgique et publié sur le site web:
www.brucella.be

Le flagelle de *Brucella melitensis* : caractérisation de la structure et de la régulation flagellaire

Par Jonathan Ferooz

RESUME

Le flagelle bactérien est un appendice rotatoire filamenteux ancré dans les membranes bactériennes et permet à la bactérie de se mouvoir. Bien que le rôle locomoteur soit principal, d'autres rôles lui sont attribués comme l'adhérence et la sécrétion. Le filament compose la plus grande partie du flagelle. Celui-ci est formé par un assemblage de protéines appelées flagellines. On estime que près de 80% des bactéries produisent un flagelle. *Brucella* est une bactérie pathogène de mammifères qui a longtemps été désignée comme non-flagellée. Cependant, les récentes découvertes ont montré que tous les gènes flagellaires étaient présents dans son génome et qu'ils étaient nécessaires lors de l'infection. Plusieurs régulateurs qui contrôlent la production des protéines flagellaires ont également été mis au jour. Néanmoins, aucun flagelle n'avait encore été visualisé chez *Brucella*.

Lors de ce travail, nous avons montré pour la première fois grâce à la microscopie optique et électronique que *B. melitensis* produit de manière transitoire un flagelle polaire de type gainé. D'autre part, nous avons aussi investigué la régulation du système flagellaire. Premièrement, nous avons étudié le rôle du facteur sigma RpoE1 sur les gènes flagellaires. Le mutant *rpoE1* surexprime les gènes flagellaires et produit des flagelles plus longs. Deuxièmement, nous avons montré que la production de la flagelline était contrôlée par des régulateurs spécifiques nommés FlbT et FlaF. FlbT est un activateur de la production de la flagelline alors que FlaF est un inhibiteur. De plus, nous avons montré que la fonction de FlbT semble conservée parmi les *Rizhobiales*. Nous avons également montré que *B. melitensis* était plus virulente en absence de flagelline, ce qui montre un rôle spécifique de la flagelline qui reste à être investigué.

Pour terminer, une analyse préliminaire *in silico* du génome de *Brucella* nous a permis de cibler d'autres régulateurs potentiels du système flagellaire. Les données récoltées lors de ce travail nous ont permis de dessiner un schéma de régulation hiérarchique des gènes flagellaires de *Brucella* en 3 classes.

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
Faculté des Sciences,
Département de Biologie
Rue de Bruxelles, 61 B-5000 Namur, Belgium

The flagellum of *Brucella melitensis* : characterization of the flagellar structure and regulation

By Jonathan Ferooz

SUMMARY

The bacterial flagellum is a rotative filamentous appendage which is anchored in the bacterial membranes and allows the bacterium to move. Besides its main locomotive function, the bacterial flagellum fulfills other functions such as adhesion and secretion. The filament, which comprises most of the flagellum structure, is formed by an assembly of proteins called flagellins. It is estimated that nearly 80% of the bacteria produce a flagellum. *Brucella* is a mammal pathogens bacterium that had long been designated as non-flagellated. However, recent discoveries have shown that all flagellar genes were present in its genome and were necessary to *Brucella*'s pathogenic ability. Several regulators that control the production of flagellar proteins have also been uncovered. However, no flagellum was viewed on *Brucella* until today.

In this work, we showed for the first time through the optical and electron microscopy that *B. melitensis* produces transitionally a polar sheathed flagellum. On the other hand, we also investigated the regulation of flagellar system. Firstly, we studied the role of sigma factor RpoE1 on flagellar genes. The *rpoE1* mutant overexpresses flagellar genes and produces a longer flagellum. Secondly, we showed that the production of flagellin was controlled by specific regulators named FlbT and FlaF. FlbT is a flagellin activator while FlaF is a flagellin inhibitor. In addition, we showed that the function of FlbT appears to be conserved among the Rizhobiales. We also showed that *B. melitensis* is more virulent in the absence of flagellin, which indicates a specific role of flagellin. The function of the flagellin of *Brucella* remains to be investigated.

Finally, a preliminary *in silico* analysis of the genome of *Brucella* has enabled us to target other potential regulators of the flagellar system. The data gathered during this work have allowed us to draw a hierarchical regulatory cascade of flagellar genes of *Brucella* in 3 classes.

« Rien ne me choque, moi, je suis un scientifique. »
Indiana Jones dans “Indiana Jones et le Temple Maudit”

« Vis comme si tu devais mourir demain. Apprends comme si tu devais vivre toujours. »
Gandhi, 1869-1948

TABLE DES MATIERES

I	INTRODUCTION.....	3
1.	LE FLAGELLE PARMIS LA DIVERSITÉ DU MONDE BACTÉRIEN.....	3
2.	LA STRUCTURE DU FLAGELLE	4
2.1.	<i>Le corps basal</i>	5
2.1.1.	L'anneau MS	6
2.1.2.	Le moteur flagellaire et l'anneau C	7
2.1.2.1.	L'anneau C	7
2.1.2.2.	Le moteur flagellaire	9
2.1.3.	Le système de sécrétion de type III flagellaire	10
2.1.4.	La tige	12
2.1.5.	Les anneaux P et L	13
2.2.	<i>Le coude</i>	13
2.2.1.	Lien entre la taille du coude et le système de sécrétion de type III flagellaire.....	14
2.3.	<i>Le filament et ses protéines de jonction</i>	16
2.3.1.	Les protéines de jonction HAP1 et HAP3.....	16
2.3.2.	Le filament et son assemblage	17
3.	LA MOBILITÉ BACTÉRIENNE LIÉE AU FLAGELLE	19
3.1.	<i>Le mouvement : le comportement</i>	19
3.2.	<i>Le chimiotactisme : le moyen</i>	21
4.	RÉGULATION DE L'ASSEMBLAGE DU FLAGELLE EN DIFFÉRENTES CLASSES	24
4.1.	<i>Le paradigme des 3 classes</i>	24
4.2.	<i>Un autre modèle en 4 classes : le cas <i>Caulobacter crescentus</i></i>	26
4.3.	<i>Les autres systèmes flagellaires en 4 classes : <i>Pseudomonas aeruginosa</i> et <i>Helicobacter pylori</i></i>	29
4.4.	<i>Quand les flagelles s'emmêlent : Le cas <i>Vibrio spp</i></i>	32
5.	EVOLUTION DES SYSTÈMES FLAGELLAIRES	35
6.	LA FLAGELLINE	39
6.1.	<i>Déclaration de guerre entre hôte et pathogène</i>	39
6.1.1.	Le système immunitaire inné face aux microorganismes	39
6.1.2.	Reconnaissance de la flagelline extracellulaire par le TLR5	40
6.1.3.	Reconnaissance de la flagelline cytosolique par les récepteurs Ipaf et Naip5	41
6.1.3.1.	Le récepteur Ipaf	42
6.1.3.2.	Le récepteur Naip5.....	42
6.2.	<i>La flagelline « sucrée »</i>	42
7.	LA PRÉSENCE D'UN SYSTÈME FLAGELLAIRE CHEZ <i>BRUCELLA</i>	45
7.1.	<i>Une bactérie appartenant à la classe des α-protéobactéries</i>	45
7.2.	<i>La brucellose : de l'animal à l'Homme</i>	47
7.2.1.	La brucellose animale.....	48
7.2.2.	Transmission de la brucellose à l'homme.....	48
7.2.3.	Signes cliniques chez l'homme	49
7.2.4.	Les personnes à risque.....	49
7.2.5.	Traitement	50
7.2.6.	La brucellose humaine en Europe.....	50
7.3.	<i>Brucella : une adepte du « cocooning » intracellulaire</i>	51
7.4.	<i>Brucella et son système flagellaire</i>	53
7.4.1.	Mise en évidence des gènes encodant une structure flagellaire.....	53
7.4.2.	Mise en évidence d'une activité des gènes flagellaires in vitro et in vivo.....	54
7.4.3.	Mise en évidence d'une régulation du système flagellaire	56
7.4.3.1.	Le régulateur VjbR.....	56
7.4.3.2.	Le régulateur BlxR	56

7.4.3.3.	Le régulateur FtcR	57
7.4.3.4.	Schéma de régulation flagellaire chez <i>Brucella</i>	57
II	OBJECTIFS.....	61
III	RESULTATS.....	65
1.	VISUALISATION D'UN FLAGELLE EN MICROSCOPIE OPTIQUE	65
2.	VISUALISATION D'UN FLAGELLE EN MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE À TRANSMISSION (TEM)	66
3.	CONSTRUCTION DES MUTANTS FLAGELLAIRES.....	69
4.	ÉTUDE DE LA PRODUCTION DE LA FLAGELLINE.....	71
5.	VISUALISATION DES MUTANTS FLAGELLAIRES EN MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE À TRANSMISSION	74
6.	FlbT CONTRÔLE LA PRODUCTION DE FLAGELLINE	75
7.	LA PRODUCTION TRANSITOIRE DE LA FLAGELLINE EST CONTRÔLÉE PAR FlbT	76
8.	EXISTENCE D'UN POINT DE CONTRÔLE SUR LA FLAGELLINE DES RHIZOBIALES	77
9.	FlaF EST UN INHIBITEUR DE LA PRODUCTION DE FLAGELLINE CHEZ <i>BRUCELLA</i>	79
10.	RÔLE DES FACTEURS SIGMA SUR LA PRODUCTION DE LA FLAGELLINE DE <i>BRUCELLA</i>	80
11.	LE FACTEUR SIGMA RPOE1 EST IMPLIQUÉ DANS L'INHIBITION DU SYSTÈME FLAGELLAIRE DE <i>BRUCELLA</i>	82
12.	ANALYSE <i>IN SILICO</i> DE REGULATEURS FLAGELLAIRES ET DE CIBLES DANS LES PROMOTEURS FLAGELLAIRES.....	85
12.1.	Le régulateur CtrA	86
12.2.	Le régulateur FtcR	86
12.3.	L'IHF.....	87
12.4.	Les facteurs sigma	88
12.4.1.	Le facteur sigma 70	88
12.4.2.	Le facteur sigma RpoE.....	89
IV	DISCUSSION	93
1.	STRUCTURE ET RÔLE DU FLAGELLE DE <i>BRUCELLA MELITENSIS</i>	93
1.1.	Structure du flagelle de <i>Brucella</i>	93
1.2.	Rôle de la gaine	94
1.3.	Rôle de la mobilité.....	96
1.4.	D'autres rôles potentiels du flagelle chez <i>Brucella</i>	97
2.	ANALYSE DE LA FLAGELLINE DE <i>BRUCELLA</i>	97
2.1.	Construction de mutants ne produisant plus de flagelline	98
2.2.	L'absence de flagelline exacerbe la virulence de <i>Brucella</i> en souris	98
2.3.	Reconnaissance de la flagelline par les cellules eucaryotes	100
3.	REGULATION DE L'EXPRESSION DES GENES FLAGELLAIRES.....	104
3.1.	Signaux de régulation des gènes flagellaires chez <i>Brucella</i>	104
3.1.1.	Composition du milieu	105
3.1.2.	La lumière.....	105
3.1.3.	Le cycle cellulaire.....	105
3.1.4.	La population bactérienne.....	106
3.2.	Implication de différents régulateurs dans le contrôle du flagelle de <i>Brucella</i>	106
3.2.1.	Le régulateur maître : FtcR	106
3.2.2.	Implication d'un régulateur du Quorum Sensing : VjbR.....	106
3.2.3.	Implication d'un autre régulateur de type LuxR : BlxR.....	107
3.2.4.	Implication d'un régulateur d'exopolysaccharides : MucR	107
3.2.5.	Implication d'un régulateur du cycle cellulaire : CtrA.....	108
3.2.6.	Implication d'un régulateur structural de l'ADN : IHF	108
3.2.7.	Implication d'un facteur sigma extracytoplasmique : RpoE1.....	108
3.2.8.	Modèle récapitulatif de régulation du flagelle de <i>Brucella</i>	111
3.3.	Régulation de la flagelline de <i>Brucella</i> par FlbT et FlaF.....	112
3.3.1.	FlbT est un activateur de la flagelline de <i>Brucella</i>	112

3.3.2.	La production de flagelline par FlbT est dépendante de FtcR.....	112
3.3.3.	Conservation du rôle de FlbT chez les Rhizobiales	114
3.3.4.	FlaF est un antagoniste de FlbT et inhibe la production de flagelline	115
3.3.5.	Régulation post-transcriptionnelle de la flagelline	116
3.4.	<i>La disparition du flagelle</i>	116
3.4.1.	Arrêt de la transcription des gènes flagellaires.....	117
3.4.2.	Ejection du flagelle	117
3.5.	<i>Hierarchie des gènes flagellaires chez Brucella</i>	118
4.	L'EFFET DE LA DENSITÉ DE POPULATION SUR LA RÉGULATION DU SYSTÈME FLAGELLAIRE DE <i>BRUCELLA</i>	123
5.	LIEN ENTRE LE FLAGELLE ET LE SYSTÈME DE SÉCRÉTION DE TYPE IV	125
6.	LE FLAGELLE COMME SOURCE DE SPÉCIATION DE <i>BRUCELLA</i> ?	127
V	PERSPECTIVES	133
1.	PERSPECTIVES SUR LA FONCTION ET LA STRUCTURE DU FLAGELLE DE <i>BRUCELLA</i>	133
2.	PERSPECTIVES SUR LA RÉGULATION DU FLAGELLE DE <i>BRUCELLA</i>	135
VI	CONCLUSION	139
VII	BIBLIOGRAPHIE	145
VIII	MATERIEL & METHODES	173
1.	SOUCHES DE BACTÉRIES ET MILIEU DE CULTURE	173
2.	TECHNIQUES DE MANIPULATION DE L'ADN	173
3.	CONSTRUCTION DES MUTANTS PAR REMPLACEMENT ALLÉLIQUE AVEC LA CASSETTE <i>APH4</i> (DOZOT ET AL., 2006)	174
4.	CONSTRUCTION DES PLASMIDES	178
4.1	<i>Construction des plasmides rapporteurs pBBCmpflgE-lacZ et pBBCmpfliC-lacZ</i>	178
4.2	<i>Construction des plasmides d'expression des gènes flaF, flbT et fliC</i>	178
4.3	<i>Construction des plasmides pour la création des mutants fliF, flgE, fliC et flbT</i>	179
5.	MIGRATION DE PROTÉINES EN GEL SDS-PAGE ET DÉTECTION PAR WESTERN BLOT	181
6.	VISUALISATION DU FLAGELLE EN MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE À TRANSMISSION (TEM) ET IMMUNOMARQUAGE AUX BILLES D'OR	181
7.	VISUALISATION DU FLAGELLE EN MICROSCOPIE OPTIQUE PAR COLORATION RYU	182
7.1	<i>Composition de la solution 1</i>	182
7.2	<i>Composition de la solution 2</i>	182
7.3	<i>Mode d'emploi</i>	182
8.	TEST DE MOBILITÉ	183
8.1	<i>Mobilité en milieu liquide</i>	183
8.2	<i>Mobilité sur milieu semi-solide</i>	183
9.	DOSAGE DE LA B-GALACTOSIDASE	183
10.	PRÉPARATION DE L'ARN	184
11.	PCR QUANTITATIVE EN TEMPS RÉEL (RT-PCR)	185
12.	INFECTION EN SOURIS BALB/C	185
IX	ANNEXES	189
	ANNEXE I : RpoE BOX	189
	ANNEXE II : IHF BOX	191
	ANNEXE III : FtcR BOX	193
	ANNEXE IV : CTRA BOX	195
	ANNEXE V : FRETIN ET AL. 2005	196
	ANNEXE VI : LÉONARD ET AL. 2007	208
X	REMERCIEMENTS	221

LISTE DES ABRÉVIATIONS

2YT	milieu de culture riche
ADN	acide désoxyribonucléique
AHL	acyl homoserine lactone
aph	aminoglycoside phosphotransférase
ARN	acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ATP	adénosine triphosphate
β-gal	enzyme β-galactosidase
BCV	Brucella Containing Vacuole
C₁₂-HSL	N-Dodécanoyl homosérine lactone
CCW	sens inverse des aiguilles d'une montre
CFU	colony forming unit
CW	sens des aiguilles d'une montre
DO	densité optique
ECF	fonction extracytoplasmique
EHEC	<i>Escherichia coli</i> entérohémorragique
EPEC	<i>Escherichia coli</i> entéropathogènes
EPS	exopolysaccharides
ERES	endoplasmic reticulum exit site
GFP	green fluorescent protein (protéine verte fluorescente)
HAP	hook associated proteins (protéines associées au coude)
ID	intelligent design (dessin intelligent)
IFN	interféron
IM	membrane interne
Ipaf	ice protease-activating factor
kDa	kiloDalton
Leg	acide légionaminique
LPS	lipopolysaccharide
LRR	leucine-rich repeat
μl	microlitre
μm	micromètre
MAPK	mitogen activated protein kinase
MCP	methyl-accepting chemotaxis proteins
MyD88	myeloid differentiation factor 88
ml	millilitre
nm	nanomètre
Naip5	neuronal apoptosis inhibitory protein 5
NLR	nod-like receptor
OM	membrane externe
ORF	open reading frame
PAMP	pathogen-associated molecular patterns
PBS	phosphate buffer saline
PCR	polymerase chain reaction
PG	couche de peptidoglycane
PRR	pattern-recognition receptors
Pse	acide pseudaminique
QS	quorum sensing

RBS	ribosome binding site
RE	réticulum endoplasmique
rpm	rotation par minute
RSAT	regulatory sequence analysis tools
RT-PCR	real-time PCR (PCR en temps réel)
SDS	dodécyl sulfate de sodium
SST3	système de sécrétion de type III
STM	signature tagged mutagenesis
TIR	toll / interleukine 1receptor
TLR	toll-like receptor
UTR	région non-traduite de l'ARNm
WT	wild type (souche sauvage)

PARTIE I

INTRODUCTION

I INTRODUCTION

1. Le flagelle parmi la diversité du monde bactérien

Bien qu'elles soient invisibles à l'œil nu, les bactéries représentent une part importante de la vie sur Terre. On estime que le nombre total de bactéries sur Terre est de 10^{30} (Whitman *et al.*, 1998).

La mobilité est un des mécanismes qui leur a permis de s'adapter au monde dans lequel elles vivent. En effet, des bactéries mobiles ont été isolées d'habitats très différents, tels que la surface de l'eau, l'environnement sous-marin volcanique, le sol ou même notre corps (Ottemann and Miller, 1997).

Le flagelle bactérien est l'une des structures les plus étudiées permettant à la bactérie de bouger dans son environnement (Jarrell and McBride, 2008). Cet appendice extracellulaire est un long filament de plusieurs dizaines de μm de long et d'environ 20 nm de diamètre. On estime qu'environ 80% des espèces bactériennes connues sont flagellées (Moens and Vanderleyden, 1996) (Soutourina and Bertin, 2003).

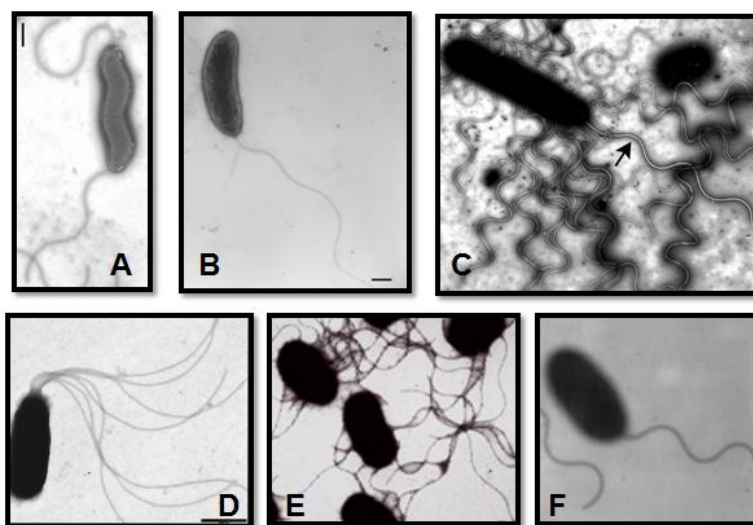


Figure 1 : Présentation des différents types de flagelles. Photos en microscopie électronique à transmission présentant (A) les flagelles à chaque pôle de *Campylobacter jejuni*, (B) le flagelle polaire de *Caulobacter crescentus*, (C) le double système comprenant un flagelle polaire gainé et de multiples flagelles péritriches de *Vibrio parahaemolyticus*, (D) les flagelles polaires lophotriches de *Vibrio fischeri*, (E) les flagelles péritriches d'*Escherichia coli*, (F) le flagelle polaire gainé plus épais de *Vibrio parahaemolyticus* (voir aussi la flèche en C) (Kamal *et al.*, 2007) (Skerker and Laub, 2004) (McCarter, 2001) (Millikan and Ruby, 2004) (Chevance and Hughes, 2008).

Beaucoup de bactéries de type Gram-négatif, Gram-positif et d'Archaeobactéries utilisent un flagelle pour se déplacer. Les flagelles des bactéries de type Gram-négatif et Gram-positif sont essentiellement similaires. La différence majeure provient de la structure supplémentaire

associée à la membrane externe chez les bactéries de type Gram-négatif. Le flagelle des Archaeobactéries est primitif et s'apparente plus à une structure entre le flagelle bactérien et le pilus de type IV (Ng *et al.*, 2006).

L'arrangement du flagelle sur la bactérie varie, et a même longtemps été utilisé pour définir les caractéristiques d'un taxon bactérien (Figure 1) (Obuchowski and Jacobs-Wagner, 2008).

Certaines bactéries présentent un flagelle polaire comme *Caulobacter crescentus*, *Pseudomonas aeruginosa* ou *Vibrio cholerae*. Les bactéries *Escherichia coli* et *Salmonella enterica* serovar Typhimurium¹ produisent une multitude de flagelles tout autour d'elles (Macnab, 1996).

D'autres variantes existent comme une multitude de flagelles à un seul pôle de *Vibrio fischeri*, un flagelle à chaque pôle de *Campylobacter jejuni*, et un ou plusieurs flagelles recouverts d'une gaine comme *Helicobacter pylori* ou *Bdellovibrio bacteriovorus* (Figure 1) (Sjoblad *et al.*, 1983).

Des cas étonnants présentent à la fois des flagelles péritriches tout autour de la bactérie et un flagelle de type gainé polaire comme *Vibrio parahaemolyticus* (McCarter, 2001) (Merino *et al.*, 2006). Les bactéries du groupe des Spirochètes produisent des flagelles dans l'espace périplasmique et entourent la bactérie, ce qui lui confère une forme particulière spiralée (Charon and Goldstein, 2002) (Charon *et al.*, 2009).

Bien que le flagelle permette à la bactérie de bouger, on lui attribue également d'autres fonctions (Moens and Vanderleyden, 1996). Par exemple le flagelle sert également de système de sécrétion pour des facteurs de virulence tel YplA chez *Yersinia enterocolitica* ou les protéines Cia chez *Campylobacter jejuni* (Young *et al.*, 1999) (Konkel *et al.*, 2004).

Chez *Pyrococcus furiosus* ou plusieurs espèces d'*Aeromonas*, il possède un rôle d'adhérence à des surfaces pour former des biofilms (Nather *et al.*, 2006) (Kirov, 2003). Les différents rôles ne seront pas détaillés ici. Notons néanmoins que le flagelle possède des fonctions étonnantes comme celle de pouvoir sentir l'humidité du milieu externe chez *S. typhimurium* (Wang *et al.*, 2005).

2. La structure du flagelle

Le flagelle bactérien est une structure complexe qui a été largement étudiée chez les entérobactéries *E. coli* et *S. typhimurium* (Macnab, 2003) (Chevance and Hughes, 2008).

Le flagelle est principalement composé de 3 parties (Figure 2) (Chevance and Hughes, 2008) (Minamino *et al.*, 2008b). La première partie est le corps basal qui est ancré dans la membrane bactérienne et est le moteur qui permet de fournir la rotation du flagelle.

¹ Par facilité nous utiliserons la dénomination de *Salmonella typhimurium* dans la suite.

La seconde partie est le coude qui transfère la rotation du corps basal à la troisième partie, le filament. Ce filament est la partie visible de la machine et la plus importante en termes de protéines flagellaires. Le filament est le propulseur de la machine.

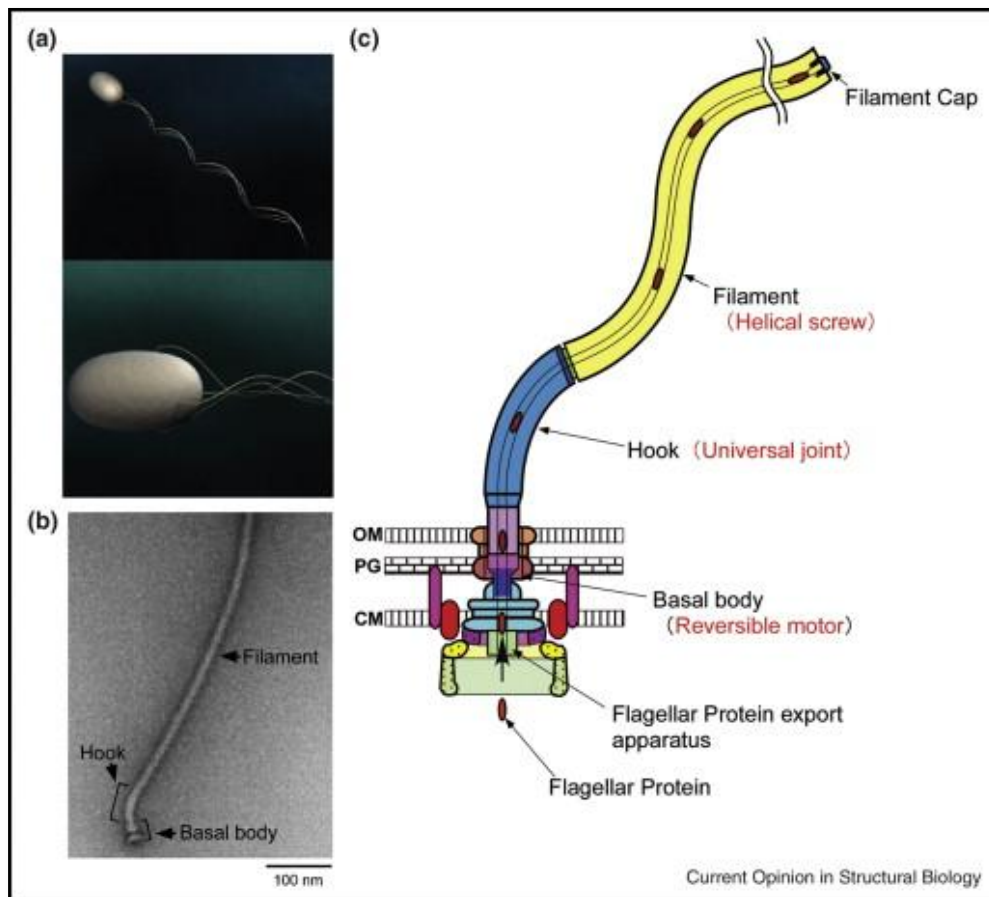


Figure 2 : Structure du flagelle bactérien. (a) Bactérie en nage propulsée par un faisceau de flagelles. (b) Photo prise en microscopie électronique d'un flagelle isolé de *S. typhimurium*. (c) Schéma du flagelle constitué de 3 parties : le corps basal qui sert de moteur rotatoire réversible (*basal body*), le coude (*hook*) qui transfère l'énergie de rotation à la troisième partie qui est le filament hélicoïdal (*filament*). OM, membrane externe; PG, couche de peptidoglycane; CM, membrane cytoplasmique (Minamino *et al.*, 2008a).

Dans cette partie, nous allons décrire brièvement les différentes parties du flagelle, ainsi que les gènes et protéines qui interviennent dans l'assemblage du flagelle.

2.1. Le corps basal

Le corps basal est la partie du flagelle située dans la membrane bactérienne qui contient le moteur flagellaire et fournit toute l'énergie nécessaire à la rotation du flagelle (Figure 3) (Minamino *et al.*, 2008a).

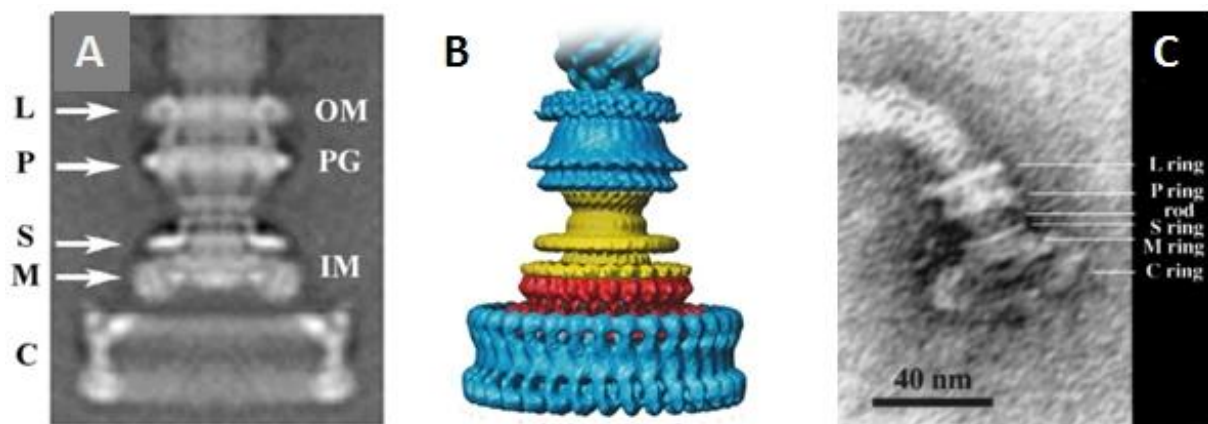


Figure 3 : Structure du corps basal. (A) Reconstitution du corps basal par superposition d'images en microscopie électronique à transmission (Thomas *et al.*, 2001). (B) Reconstruction du corps basal de *S. typhimurium* en 3 dimensions (DeRosier, 2006). (C) Image d'un seul corps basal du flagelle de *S. typhimurium* en microscopie électronique à transmission (Lux *et al.*, 2000). L ring, anneau de la membrane externe (OM) ; P ring, anneau dans la couche de peptidoglycane (PG); rod, tige ; MS ring, anneau dans la membrane cytoplasmique (IM) ; C ring ; partie cytoplasmique du flagelle en forme d'anneau.

Le corps basal est constitué d'une plateforme dans la membrane cytoplasmique (l'anneau MS) sur laquelle vont s'ancrer le moteur flagellaire qui permettra la rotation de la structure et un système de sécrétion qui fournira les protéines flagellaires au reste de la structure.

Les protéines sécrétées passeront dans un tube creux (la tige) qui traverse toutes les membranes bactériennes jusqu'à l'extérieur de la bactérie. Le corps basal est également constitué de plusieurs anneaux protéiques qui ont un rôle de protection de la structure et d'ancrage dans les membranes. Ces structures vont être brièvement décrites ci-dessous.

2.1.1. L'anneau MS

La formation du flagelle débute par l'intégration de protéines FliF dans la membrane cytoplasmique (Kubori *et al.*, 1992). Cet assemblage constitué de 26 sous-unités de FliF forme un anneau appelé « MS-ring » (Figure 4) (Ueno *et al.*, 1992).

Au départ considérés comme deux anneaux distincts (anneau M pour « membrane » et anneau S pour « supramembrane »), il s'avère que ces deux anneaux ne forment qu'une seule et même structure composée de la même protéine FliF (Ueno *et al.*, 1992).

Ce premier anneau forme une plateforme avec un pore central qui permettra l'insertion du système de sécrétion (Kihara *et al.*, 2001) (Macnab, 2003). L'anneau MS est aussi en contact avec la tige du flagelle et l'anneau C cytoplasmique (Figure 4c) (Francis *et al.*, 1994).

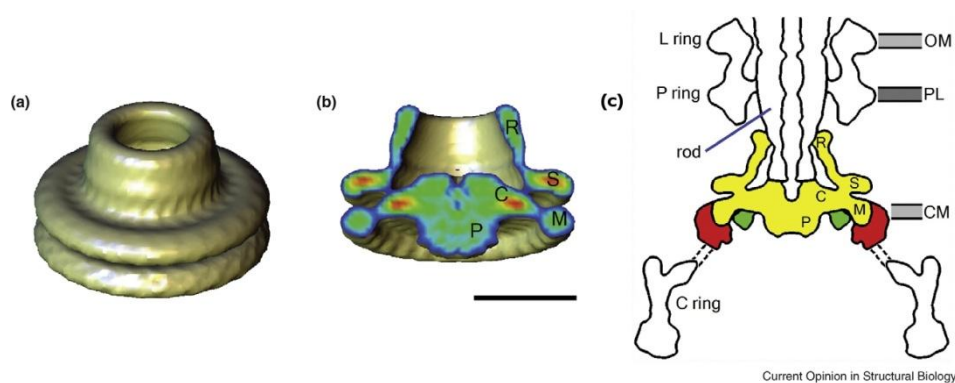


Figure 4 : Structure de l'anneau MS. (a) Représentation tridimensionnelle de la surface de l'anneau MS. (b) Coupe transversale de l'anneau MS. L'anneau MS est divisé en 5 domaines marqués P, C, M, S et R (Suzuki *et al.*, 2004) (Minamino *et al.*, 2008a). (c) En jaune, situation de l'anneau MS dans la structure du corps basal. En rouge position probable de FliG et en vert domaine non occupé par FliF et FliG (Suzuki *et al.*, 2004) (Minamino *et al.*, 2008a).

2.1.2. Le moteur flagellaire et l'anneau C

Le moteur flagellaire est le système qui va fournir l'énergie nécessaire à la rotation du flagelle et lui permettre de tourner. Ce système peut être divisé en deux parties principales: le stator et le rotor (Macnab, 2003).

Le stator est un complexe de protéines situé dans la membrane cytoplasmique (les protéines Mot) alors que le rotor est une partie du corps basal contenant l'anneau C qui subira la rotation. Le fonctionnement de ce moteur sera expliqué après une brève description de l'anneau C.

2.1.2.1. L'anneau C

L'anneau C est formé des protéines FliG, FliM et FliN et s'insère à la face cytoplasmique de l'anneau MS (Figure 5A) (Francis *et al.*, 1994). Ces 3 protéines forment ce que l'on appelle le « *switch complex* » car l'anneau C intervient dans le changement de sens de rotation du flagelle (Berg, 2003). Ce changement de rotation est nécessaire pour que la bactérie puisse changer de direction lors de son déplacement (voir point 3.1).

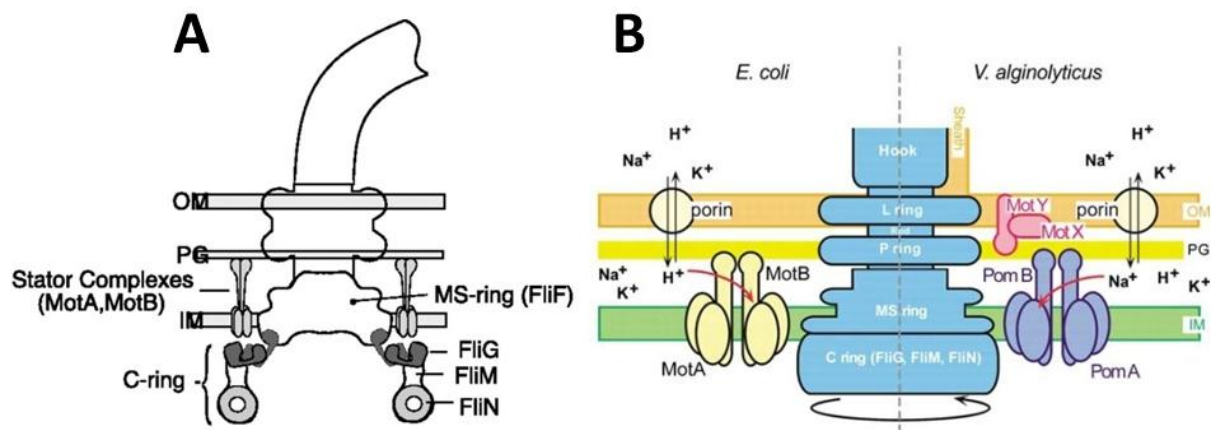


Figure 5 : Représentation schématique de l'anneau C et du moteur flagellaire (Brown *et al.*, 2007). (A) La conformation précise de FliG dans l'anneau C n'est pas connue, pour cette raison les deux possibilités sont présentées dans ce schéma. (B) Représentation schématique du moteur flagellaire à proton chez *E. coli* et du moteur flagellaire à sodium chez *V. alginolyticus* (Yonekura *et al.*, 2006). Le flagelle de *V. alginolyticus* est gainé (*sheath*) (voir point 1). L'énergie est fournie par un potentiel électrique et chimique généré par le passage d'ions à travers la membrane interne. Le stator est hypothétiquement composé des complexes (MotA)₄(MotB)₂ ou (PomA)₄(PomB)₂ selon l'espèce bactérienne. OM, membrane externe ; PG, couche de peptidoglycane ; CM, membrane cytoplasmique.

FliG forme la partie de l'anneau C qui fait la jonction entre l'anneau MS et le rotor flagellaire (Brown *et al.*, 2007). Cette protéine est à la base de la rotation du flagelle mais participe aussi au changement du sens de rotation (Macnab, 2003). Dans l'anneau C, FliG est en contact direct avec la protéine FliM (Passmore *et al.*, 2008).

La protéine FliM forme quant à elle la partie du flagelle liée au système du chimiotactisme (voir point 3.2) (Toker and Macnab, 1997). Une fois phosphorylée, la protéine du système du chimiotactisme CheY se fixe à FliM (Khan *et al.*, 2000; Mathews *et al.*, 1998; Sagi *et al.*, 2003). C'est grâce à ce signal que le sens de rotation va changer (Park *et al.*, 2006).

Pour terminer, l'anneau C est principalement constitué à son extrémité cytoplasmique de la protéine FliN (Paul and Blair, 2006). Bien que FliN soit essentielle au rôle de l'anneau C, sa fonction précise est encore inconnue. Il est néanmoins probable que FliN soit associée avec le système de sécrétion et/ou avec le système de chimiotactisme (Gonzalez-Pedrajo *et al.*, 2006) (Paul *et al.*, 2006) (McMurry *et al.*, 2006).

Ce système est sans doute encore plus complexe que décrit initialement et il est possible qu'il interagisse avec d'autres systèmes comme la respiration anaérobie. En effet, on a récemment découvert que l'enzyme FRD (Fumarate Réductase) interagissait directement avec FliG et intervenait dans le changement du sens de rotation chez *E. coli* (Cohen-Ben-Lulu *et al.*, 2008).

2.1.2.2. Le moteur flagellaire

Le moteur flagellaire est composé d'un *stator* immobile qui fournit la rotation au *rotor*. L'énergie nécessaire à la rotation de toute la structure flagellaire est fournie grâce à une différence de potentiel électrochimique provoquée par le passage d'ions à travers la membrane cytoplasmique (Nakamura *et al.*, 2009).

Le stator est composé par les protéines MotA et MotB dans une stœchiométrie (MotA)₄(MotB)₂ (Kojima and Blair, 2004). Ce stator fonctionne comme une sorte de pompe à protons située dans la membrane cytoplasmique (Figure 6). Un domaine de MotB est accroché à la couche de peptidoglycane et maintient fixement le stator (Roujeinikova, 2008). Quant à la protéine MotA, elle fait tourner le rotor grâce à un contact avec FliG (Zhou *et al.*, 1998) (Braun *et al.*, 1999).

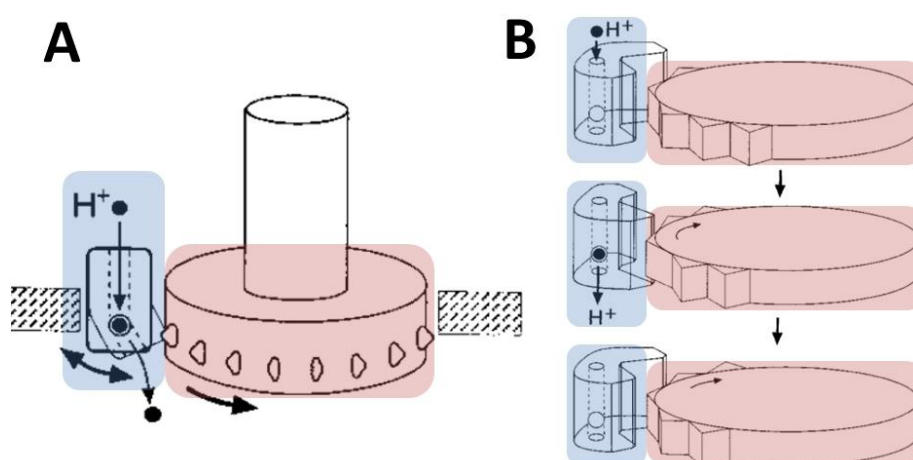


Figure 6 : Mécanisme de rotation du flagelle. (A) Le passage du proton dans le stator induit un changement de conformation de celui-ci qui provoque une rotation du rotor. (B) Présentation du mécanisme de rotation en 3 étapes lors du passage d'un proton (Kojima and Blair, 2001). H⁺, proton.

Le stator ainsi formé va convertir l'influx de proton en travail mécanique, c'est-à-dire la rotation (Berg, 2003) (Figure 6). Lorsque les protons traversent la membrane, ils se fixent au résidu aspartate de MotB, ce qui engendre un changement de conformation du stator. C'est ce changement de conformation qui provoque le mouvement du rotor en poussant FliG (Kojima and Blair, 2001).

Cette étape est suivie par une déprotonation du résidu aspartate qui libère le proton dans le cytoplasme et restore ainsi la conformation originale du stator (Macnab, 2003) (Jarrell and McBride, 2008). Chez certaines bactéries comme *Bacillus*, ou certaines espèces de *Vibrio*, le moteur diffère et fonctionne avec des ions sodium (Figure 5B) (Yorimitsu and Homma, 2001).

2.1.3. Le système de sécrétion de type III flagellaire

Il est probable que le système de sécrétion soit une des premières parties de la structure flagellaire à être assemblée en coordination avec l'anneau MS (Macnab, 2003).

Le système de sécrétion de type III flagellaire (ou appareil d'export) va permettre l'assemblage du flagelle par sécrétion des protéines flagellaires dans le corps basal en cours de formation (Macnab, 2004). Ensuite, les protéines flagellaires synthétisées dans le cytoplasme vont traverser l'espace périplasmique, la membrane externe puis se retrouver dans l'espace extracellulaire où elles vont être assemblées en coude et en filament (Minamino *et al.*, 2008b).

L'appareil d'export flagellaire est constitué de 6 protéines membranaires (FlhA, FlhB, FliO, FliP, FliQ et FliR) et de 3 protéines cytoplasmiques (FliH, FliI et FliJ) (Figure 7) (Minamino *et al.*, 2008b).

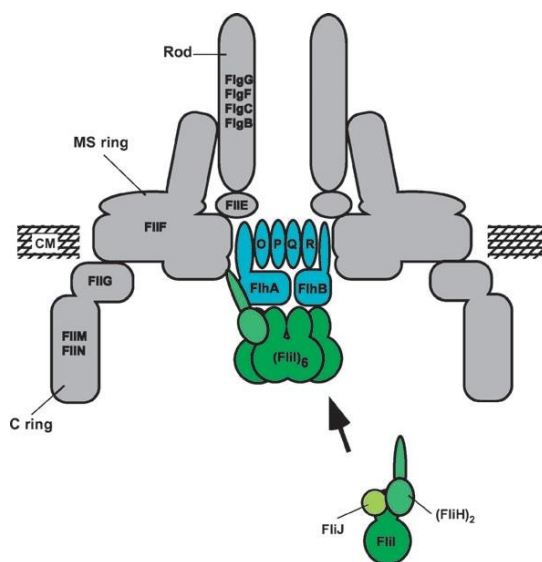


Figure 7 : Schéma du système de sécrétion de type III flagellaire. Les protéines membranaires FlhA, FlhB, FliO, FliP, FliQ et FliR sont localisées dans le pore central formé par l'anneau MS (en bleu). Les protéines FlhA et FlhB ont de larges domaines cytoplasmiques localisés dans la cavité de l'anneau C. FlhA et FlhB forment une plateforme pour l'ATPase FliI et son régulateur FliH. Dans le cytoplasme, FliI forme un hétérotrimère avec un dimère de FliH et la chaperonne FliJ empêche une agrégation de ces structures. Lorsqu'il se fixe à la plateforme FlhA-FlhB, le complexe FliH/I forme un hexamère (en vert). CM, membrane cytoplasmique (Minamino *et al.*, 2008b).

Les protéines cytoplasmiques FliH, FliI et FliJ forment un complexe soluble qui fixe les protéines à exporter, les guide vers la partie membranaire du système de sécrétion, et fournit l'énergie nécessaire à l'initiation de l'export (Minamino and MacNab, 2000) (Minamino *et al.*, 2008b).

FliI est l'ATPase qui fournit l'énergie nécessaire à l'export des protéines par hydrolyse de l'ATP (Imada *et al.*, 2007). FliH régule l'activité ATPase de FliI (Minamino *et al.*, 2002). Quant à FliJ, elle agirait principalement comme une chaperonne (Minamino *et al.*, 2000a). Le

mécanisme d'exportation des protéines flagellaires par le système de sécrétion de type III flagellaire est présenté brièvement à la Figure 8.

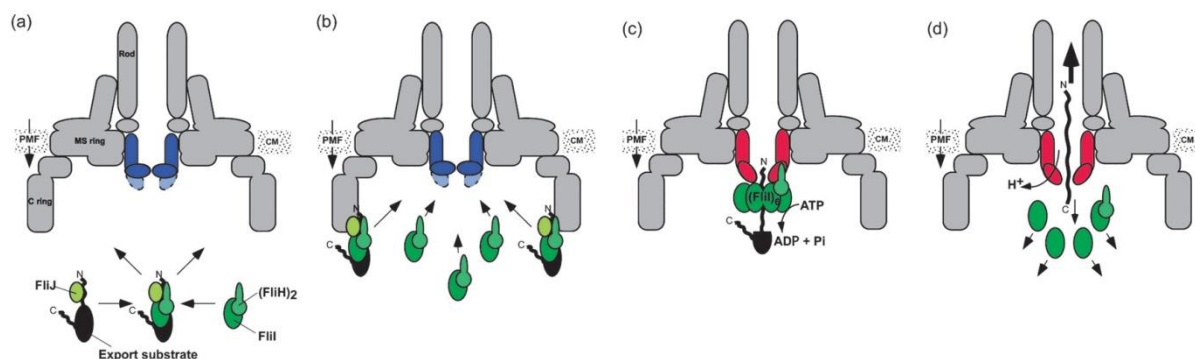


Figure 8 : Mécanisme d'exportation des protéines flagellaires. (a) La chaperonne FliJ (vert clair) se fixe sur la protéine à exporter (en noir) puis au complexe FliH₂FliI (vert foncé) dans le cytoplasme. (b) Le nouveau complexe FliH₂FliI-FliJ-protéine se fixe à l'anneau C via l'interaction de FliH avec FliN. (c) L'interaction entre FliJ et FliM de l'anneau C permet ensuite la libération du complexe FliH₂FliI-protéine et la fixation de celui-ci sur la plateforme formée par les protéines membranaires du système de sécrétion (en rouge). A cet endroit, FliI forme un anneau hexamérique qui va engager la sécrétion de la protéine flagellaire via sa partie N-terminale. (d) Dès que la partie N-terminale de la protéine est fixée à l'entrée du système de sécrétion, l'hydrolyse de l'ATP par FliI permet la libération de la protéine du complexe FliH-FliI. Ensuite, celui-ci se désagrège. La déstructuration de la protéine et sa sécrétion via le pore de 2 nm de diamètre est produit grâce à la force protomotrice. En bleu, système de sécrétion fermé; en rouge, système ouvert en cours de sécrétion (Minamino *et al.*, 2008b).

Notons qu'il y a encore quelques années, il était unanimement admis que seul l'ATP fournissait l'énergie nécessaire à la sécrétion des protéines flagellaires (Fan and Macnab, 1996). Cependant, de nouvelles données expérimentales ont prouvé il y a peu que bien que l'ATP soit sans doute nécessaire pour les premières étapes de la sécrétion des protéines flagellaires, la source d'énergie majeure provient des protons (Paul *et al.*, 2008) (Minamino and Namba, 2008).

Le système de sécrétion flagellaire est similaire au système de sécrétion de type III (SST3) ou « injectisome » (Figure 9) (Blocker *et al.*, 2003) (Cornelis, 2006). Cette homologie est partagée du point de vue de la structure, mais également sur le système de régulation (Plano *et al.*, 2001) (Minamino *et al.*, 2008b).

En effet, 9 protéines de l'appareil de sécrétion de type III sont similaires aux composantes flagellaires (Cornelis, 2006). Bien qu'il ait souvent été décrit que le système de sécrétion flagellaire était l'ancêtre du SST3, des récentes études de phylogénétiques démontrent que les deux structures seraient aussi anciennes l'une que l'autre, et partageraient un ancêtre commun (Gophna *et al.*, 2003). Néanmoins, les avis divergent encore et le débat reste ouvert sur cette question (Saier, 2004).

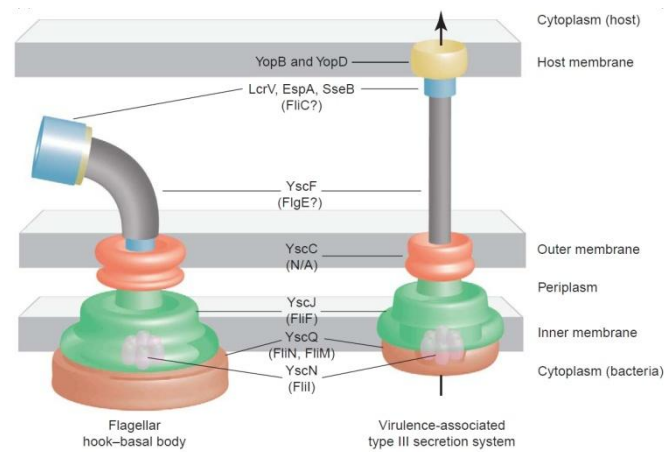


Figure 9 : Comparaison entre le système de sécrétion flagellaire (à gauche) et le système de sécrétion de type III (SST3) (à droite). Les protéines flagellaires homologues aux protéines du système de sécrétion sont entre parenthèses et les lignes désignent les parties de la structure en commun (Yip and Strynadka, 2006).

2.1.4. La tige

La tige est un canal creux d'un diamètre d'environ 2 nm qui traverse les membranes bactériennes pour permettre l'exportation des protéines flagellaires. Les protéines formant la tige sont les premières protéines à être exportées par le système de sécrétion. Cette tige est composée des protéines FlgB, FlgC, FlgF et FlgG qui vont s'auto-assembler dans la structure après leur export (Figure 10) (Homma *et al.*, 1990) (Saijo-Hamano *et al.*, 2004).

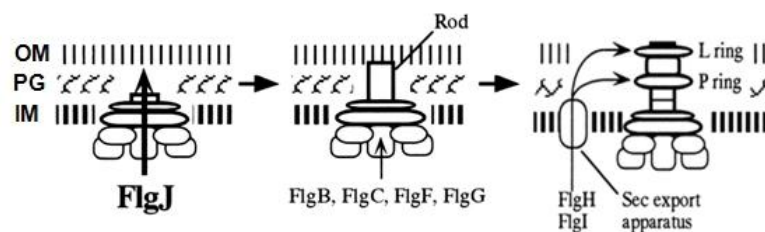


Figure 10 : Assemblage de la tige à travers les 3 enveloppes bactériennes. FlgJ digère la couche de peptidoglycane (PG) et FlgH la membrane externe (OM) pour permettre le passage de la tige formée de FlgB, FlgC, FlgF et FlgG (Nambu *et al.*, 1999).

La structure de la tige est probablement liée à la protéine FliF (l'anneau MS) grâce à la protéine FliE qui aurait un rôle d'adaptateur structural (Minamino *et al.*, 2000b). FlgF est localisée à l'autre extrémité de la tige et sert de jonction avec les protéines du coude (FlgE) (Macnab, 2003).

L'ordre des autres protéines dans la structure est actuellement inconnu. Lors de la formation de la tige, la protéine FlgJ permet l'assemblage de la tige mais dégrade également la couche de peptidoglycane grâce son activité hydrolase (Hirano *et al.*, 2001) (Nambu *et al.*, 2006). Cette dégradation facilite le passage de la tige dans la couche de peptidoglycane (Figure 10).

2.1.5. Les anneaux P et L

L'anneau P et l'anneau L sont deux structures cylindriques autour de la tige et sont formés respectivement par les protéines FlgI et FlgH (Figure 10) (Hizukuri *et al.*, 2006) (Schoenhals and Macnab, 1996).

L'anneau P est ancré dans la couche de peptidoglycane et sert de protection pour la tige (Hizukuri *et al.*, 2008). Dans la couche de peptidoglycane, la polymérisation de FlgI nécessite la présence de la chaperonne FlgA (Figure 11). Après le passage de FlgI et de FlgA à travers la membrane cytoplasmique par le système Sec, FlgA agirait comme une chaperonne dans l'espace périplasmique pour faciliter la polymérisation de FlgI (Nambu and Kutsukake, 2000).

L'anneau L est formé par la lipoprotéine FlgH et serait en interaction avec FlgI pour former un complexe anneau P/L (Apel and Surette, 2008).

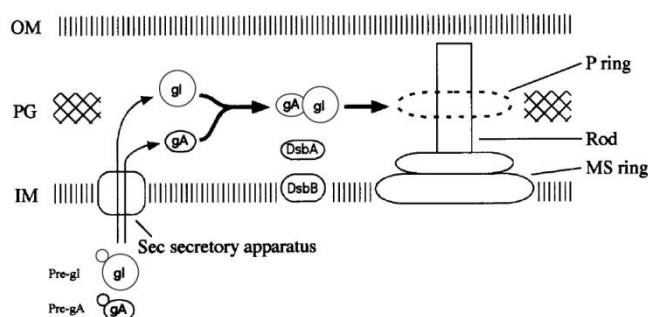


Figure 11 : Modèle du rôle de chaperonne de FlgA lors de la formation de l'anneau P. FlgA est exporté dans l'espace périplasmique et interagit directement avec FlgI pour faciliter la formation de l'anneau P (Nambu and Kutsukake, 2000). gA, forme mature de la protéine FlgA ; gl, forme mature de la protéine FlgI ; OM, membrane externe ; PG, couche de peptidoglycane ; IM, membrane interne.

2.2. Le coude

Le coude est une courte structure tubulaire qui fait office de charnière entre le moteur flagellaire et le filament. Sa flexibilité permet de transférer l'énergie de la rotation du moteur au filament plus rigide (Samatey *et al.*, 2004) (Shaikh *et al.*, 2005). Le coude est constitué d'environ 120 copies de la protéine FlgE et mesure précisément 55 ± 6 nm (Figure 12) (Samatey *et al.*, 2004) (Hirano *et al.*, 1994) (Martz, 2004).

Après l'assemblage de la tige, FlgD s'assemble en chapeau au bout de la structure pour permettre l'assemblage des protéines FlgE et former un coude (Ohnishi *et al.*, 1994).

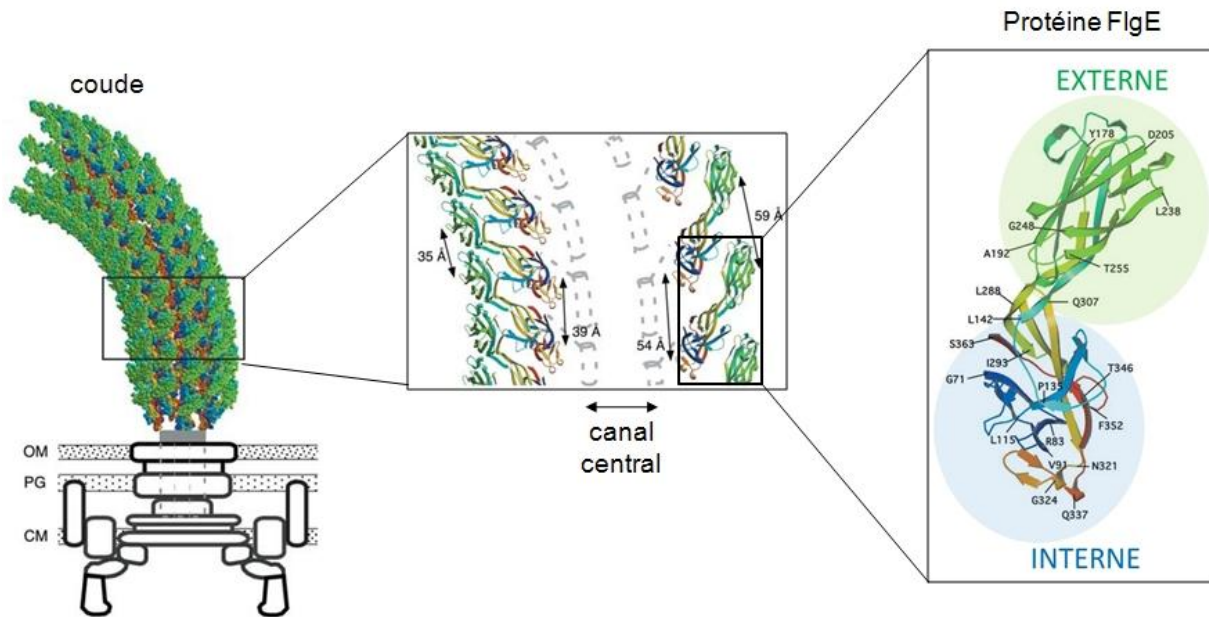


Figure 12 : Structure du coude. Agrandissement de gauche à droite de l'agencement des protéines FlgE dans la structure du coude. La partie verte de la protéine FlgE est la partie présentée à la face externe du coude et la partie bleue est la partie formant le canal interne du coude. Figure modifiée (Samatey *et al.*, 2004).

2.2.1. Lien entre la taille du coude et le système de sécrétion de type III flagellaire

La taille précise de 55 nm du coude est un processus finement contrôlé. Le régulateur FliK est l'acteur principal de ce processus et utilise un mécanisme similaire à celui utilisé pour contrôler la taille de l'aiguille des systèmes de sécrétion de type III (Cornelis, 2006).

Selon un premier modèle appelé « *cup model* », les protéines FlgE engorgent l'anneau C et empêchent la sécrétion de FliK (Figure 13) (Muramoto *et al.*, 1999) (Makishima *et al.*, 2001).

L'assemblage du coude dégorge progressivement l'anneau C permettant ensuite l'interaction de FliK avec le système de sécrétion flagellaire. Cette interaction change la spécificité des protéines sécrétées, passant des protéines du coude aux protéines de la flagelline pour l'assemblage du filament.

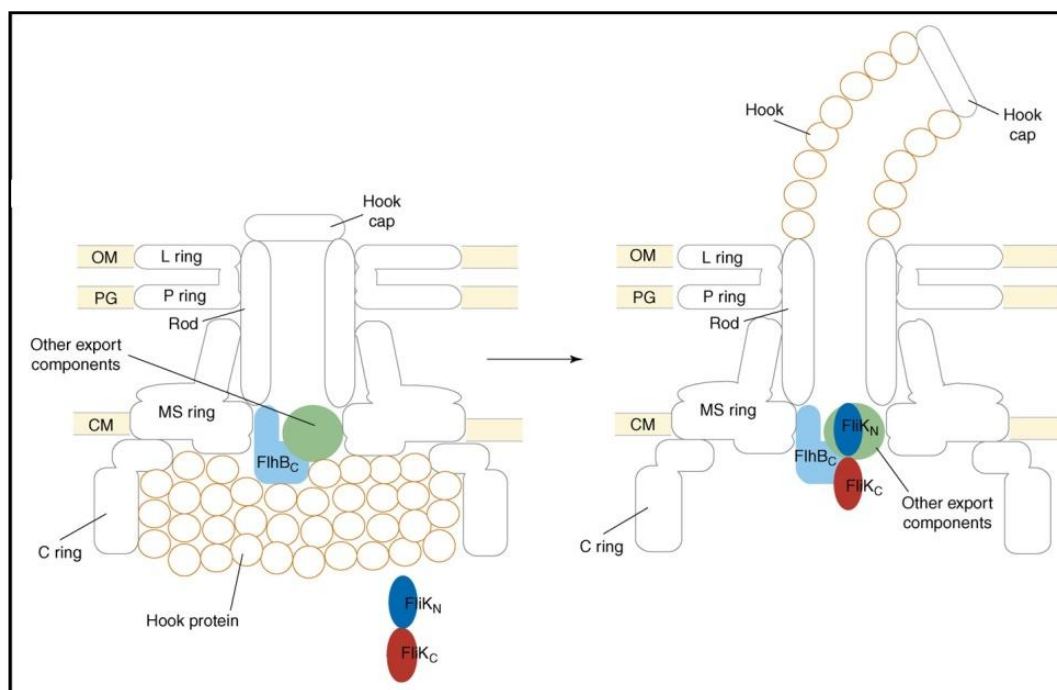


Figure 13 : Modèle de régulation du contrôle de la longueur du coude par FliK nommé « *cup model* ». Dans ce modèle, l'anneau C stocke les sous-unités de protéines FlgE avant leur sécrétion. Lors de la sécrétion, l'anneau C se vide et FliK peut interagir avec le domaine cytoplasmique de FlhB (FlhB_C) ce qui provoque un changement de spécificité des protéines sécrétées par le système de sécrétion (Ferris and Minamino, 2006).

En fait, un autre mécanisme fut proposé après les récentes découvertes sur un mécanisme similaire de régulation de la longueur de l'aiguille des injectisomes (Moriya *et al.*, 2006) (Shibata *et al.*, 2007) (Journet *et al.*, 2003).

Dans ce nouveau modèle, c'est la longueur et la structure de FliK qui semble déterminer la longueur du coude (Waters *et al.*, 2007) (Minamino *et al.*, 2004). Lorsque FliK est exportée, celle-ci se déploierait, entrerait en contact à la fois avec le système d'exportation et le coude en formation (Minamino *et al.*, 2008b) (Figure 14).

FliK est divisé en une partie C-terminale et une partie N-terminale. La partie N-terminale se fixe sur le chapeau du coude en formation et va être le senseur et le transmetteur de l'information sur la longueur du coude (Minamino *et al.*, 2004) (Hirano *et al.*, 2005).

Le coude en formation génère donc un signal sur l'état de son assemblage qui est transféré au système d'exportation par FliK. Une fois la taille du coude atteinte, le signal transmis par FliK change la spécificité du substrat, ce qui a pour conséquence de stopper l'exportation de FlgE et de passer à l'assemblage du filament.

Ce signal est transmis à la partie C-terminale qui interagit avec le système d'exportation via FlhB et provoque un changement de conformation de FlhB (Williams *et al.*, 1996) (Minamino *et al.*, 2008b). Ce changement de conformation change ensuite la spécificité des protéines exportées pour permettre l'assemblage du filament.

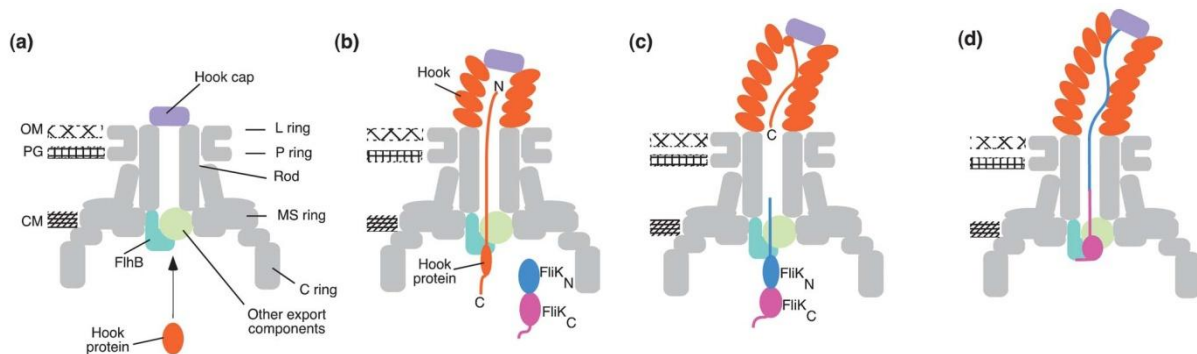


Figure 14 : Autre modèle du mécanisme de contrôle de la longueur du coude par FliK. Le système de sécrétion de type III flagellaire (en vert) incluant FlhB (en vert foncé) sont localisés dans le pore central formé par l'anneau MS. (a) et (b) Les protéines FlgE (en orange) exportées s'auto-assemblent au bout du coude en formation à l'aide du chapeau formé par FlgD (en mauve). (c) FliK est exporté occasionnellement durant l'assemblage du coude, ce qui provoque un repliement et une fixation des protéines FlgE juste en dessous du chapeau au bout du coude en formation. (d) FliK_N (bleu foncé) non replié dans le canal central fixe temporairement sa partie N-terminale au chapeau du coude. La conformation dépliée de FliK_N et une partie de FliK_C (en rose) atteignent une longueur de 90 nm qui correspond à la longueur de la tige et du coude réunis. Le reste de la partie de FliK_C interagit avec la partie FlhB_C quand le coude atteint une longueur de 55 nm (Moriya *et al.*, 2006).

A l'heure actuelle, plusieurs modèles pour expliquer l'action de FliK sur la régulation de la taille du coude existent et le débat sur cette question est encore ouvert (Waters *et al.*, 2007).

2.3. Le filament et ses protéines de jonction

Le filament est un long tube cylindrique avec une forme hélicoïdale qui agit comme un propulseur (Macnab, 2003). Cette structure est formée de 11 protofilaments de flagelline (la protéine FliC). C'est l'agencement de la flagelline dans ces protofilaments qui crée la structure hélicoïdale du filament (Samatey *et al.*, 2001) (Yonekura *et al.*, 2003).

2.3.1. Les protéines de jonction HAP1 et HAP3

Après l'assemblage du coude, le chapeau formé de protéines FlgD disparaît et est remplacé par une structure de jonction entre le coude et le filament (Macnab, 2003). Cette jonction est formée par les protéines FlgK et FlgL, aussi appelées respectivement HAP1 et HAP3 (Hook Associated Proteins) (Homma and Iino, 1985) (Apel and Surette, 2008).

L'exportation de ces protéines nécessite l'action de la protéine FlgN qui jouerait un rôle de chaperonne en empêchant la polymérisation de ces protéines dans le cytoplasme et en les guidant vers le système de sécrétion de type III (Bennett *et al.*, 2001) (Fraser *et al.*, 1999).

2.3.2. Le filament et son assemblage

Le filament est la plus grande partie du flagelle. Il peut atteindre jusqu'à 15 μm de long et est formé d'environ 20000 sous-unités de flagelline (ou FliC) (Macnab, 2003). Le filament a un rôle de propulseur et est capable de changer de forme lors du changement de direction de rotation du flagelle (Chevance and Hughes, 2008).

La structure tridimensionnelle de la flagelline est disponible depuis quelques années et montre qu'elle possède une forme en lettre grecque Γ (Figure 15) (Samatey *et al.*, 2001) (Yonekura *et al.*, 2003).

La séquence peptidique du domaine de la flagelline exposé à la surface du filament est très variable chez les différentes espèces bactériennes (dans les domaines D2 et D3). Par contre, la séquence de la partie interne au filament est très conservée (les domaines D0 et D1) (Beatson *et al.*, 2006).

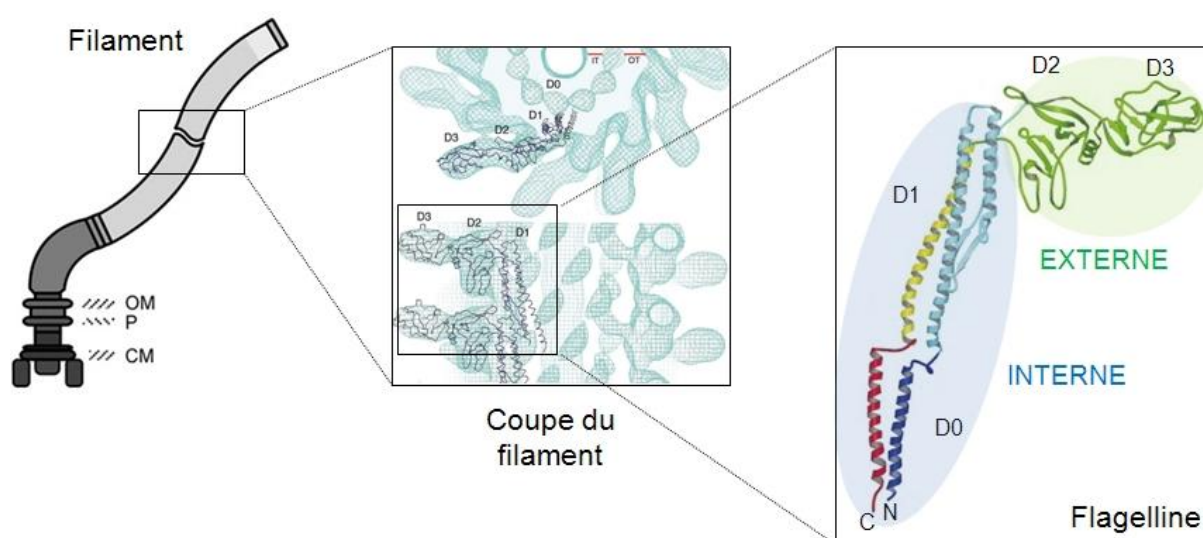


Figure 15 : Structure du filament. Agrandissement de gauche à droite de l'agencement de la flagelline dans la structure du filament. Au centre, coupe transversale et horizontale du filament avec agencement de la flagelline dans la structure. La carte de densité au centre est de 20 Å. IT, partie interne du filament; OT, partie externe du filament. A droite, structure de la flagelline et de ses 4 domaines. D0, domaine situé dans la partie interne du filament (bleu clair) et comprenant la partie C-terminale (rouge) et N-terminale (bleu foncé). D2 et D3, domaines situés dans la partie externe du filament (vert). Figure modifiée (Macnab, 2003) (Samatey *et al.*, 2001) (Yonekura *et al.*, 2003).

Lors de l'assemblage de FlgK et FlgL au bout du coude, une troisième protéine appelée FliD (ou HAP2) vient s'assembler tout au-dessus du coude. De façon similaire à FlgD, FliD forme un chapeau au-dessus du filament en formation. Cette protéine forme un pentamère qui assemble les sous-unités de flagelline une à une pour former le filament (Figure 16) (Vonderviszt *et al.*, 1998), (Yonekura *et al.*, 2000).

Le pentamère de FliD est muni de 5 pieds qui introduisent les monomères de flagelline dans le filament en construction. Le passage et l'ajout du monomère dans le filament change

la conformation du pentamère, ce qui provoque l'ajout d'une nouvelle sous-unité de flagelline et ainsi de suite (Figure 16C) (Maki-Yonekura *et al.*, 2003).

Cette étape de l'assemblage termine la production du flagelle. La fonction du flagelle lors de la mobilité est abordée dans le prochain paragraphe.

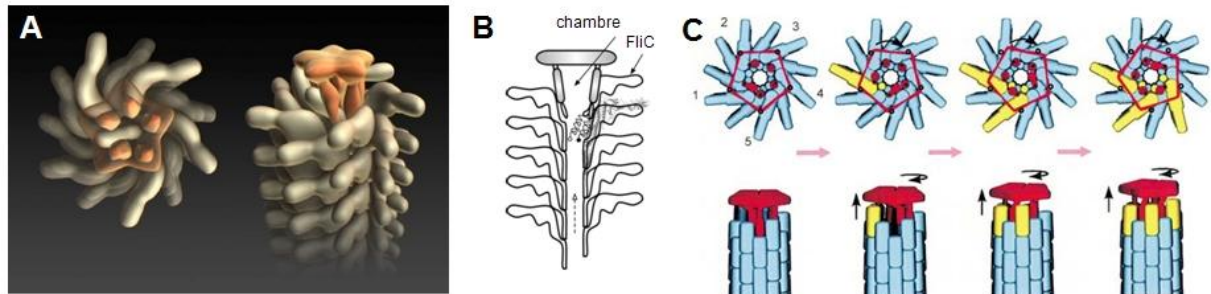


Figure 16 : Assemblage du filament. (A) Schéma de l'assemblage du filament par ajout de sous-unités de flagelline grâce au pentamère de FliD (en orange). Les pieds du pentamère ajoutent la flagelline au filament en formation. (B) Coupe transversale du filament. Le pentamère participe au repliement de la flagelline (FliC) dans la chambre au bout du filament. (C) Schéma de l'ajout de sous-unités de flagelline (en jaune) dans un filament en formation (bleu). Figure modifiée (Namba, 2004) (Chng and Kitao, 2008) (Yonekura *et al.*, 2002).

3. La mobilité bactérienne liée au flagelle

Les bactéries possèdent d'autres structures pour leur permettre de bouger, comme par exemple, les « pieds » chez *Mycoplasma mobile* (Uenoyama and Miyata, 2005) (Nakane and Miyata, 2007).

Bien que les bactéries puissent utiliser différents moyens de locomotion, nous ne discuterons ici que du déplacement lié au fonctionnement du flagelle bactérien. Pour un aperçu des autres modes de mobilité, nous conseillons les revues de Bardy *et al.* et Jarrell *et al.* (Bardy *et al.*, 2003) (Jarrell and McBride, 2008).

3.1. Le mouvement : le comportement

Pour survivre dans un milieu hostile en perpétuel changement, les bactéries ont développé un système de locomotion efficace (Wadhams and Armitage, 2004). Non seulement les bactéries sont capables de se déplacer, mais de plus, elles ont mis au point un système complexe pour pouvoir se diriger dans leur environnement. Ce comportement a été particulièrement bien étudié chez *Escherichia coli*.

Grâce au déplacement, les bactéries peuvent disposer plus facilement de leurs nutriments, éviter les substances toxiques, migrer vers leur hôte favori et avoir accès à une niche de réplication, ou se disperser dans l'environnement afin de faciliter la transmission à un nouvel hôte (Ottemann and Miller, 1997) (Josenhans and Suerbaum, 2002).

La bactérie *E. coli* se déplace dans un milieu liquide en alternant la nage et de courts moments de pauses. C'est lors de ces pauses que la bactérie se réoriente. La nage est produite par une rotation du flagelle dans le sens anti-horloger (CCW) qui produit un rassemblement des flagelles en faisceau. Ce faisceau de flagelles produit une force qui propulse la bactérie. Par contre, la réorientation est produite par une rotation des flagelles dans le sens horloger (CW), ce qui a pour conséquence de changer la conformation des flagelles et de désorganiser le faisceau de flagelles (Figure 17b).

A chaque pause, la bactérie a la possibilité de se réorienter de manière aléatoire (Armitage and Schmitt, 1997). Bien que la direction de la nage soit aléatoire, le temps de la nage est plus long lorsque la bactérie se dirige vers un milieu favorable (Sourjik, 2004). Cela a également pour effet de diminuer les périodes de réorientation.

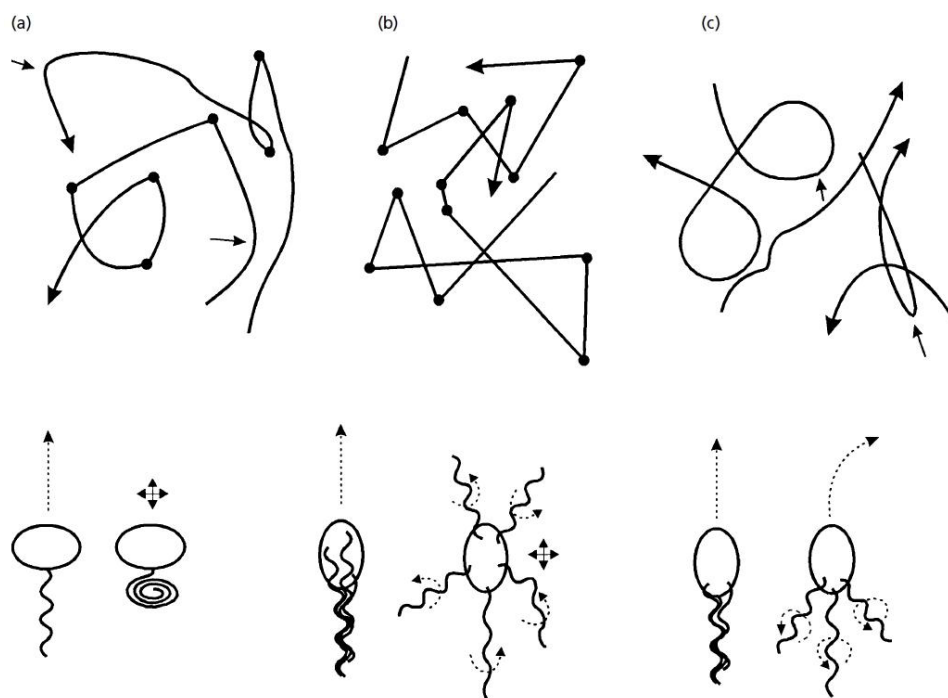


Figure 17 : Type de mouvement produit par le flagelle de (a) *Rhodobacter sphaeroides*, (b) *Escherichia coli*, (c) *Sinorhizobium meliloti*. En haut, trajectoire en 3 dimensions suivie par la bactérie, en bas, comportement de la bactérie. (a) *R. sphaeroides* à un moteur unidirectionnel qui peut changer sa vitesse et s'arrêter périodiquement. Lorsque le moteur s'arrête, le flagelle se relâche et prend une conformation repliée (en forme de spirale). La diminution de la vitesse de rotation provoque alors une réorientation de la bactérie. (b) *E. coli* nage en formant un faisceau de flagelles lorsque ceux-ci tournent dans le sens anti-horloger. Périodiquement, le sens de rotation change vers le sens horloger et le faisceau de flagelles se défait. La bactérie bouge sur place et se réoriente pour la prochaine étape de nage. (c) *S. meliloti* forme un faisceau de flagelles qui ne tournent que dans le sens horloger. La vitesse du moteur d'un flagelle peut changer individuellement et provoquer une séparation des filaments, ce qui engendre un virage dans la trajectoire. Les flagelles ne s'arrêtent jamais de tourner et ne changent jamais de direction de rotation (Armitage and Schmitt, 1997). Les petites flèches sur les trajectoires en haut indiquent un changement de direction dû à un changement de vitesse de rotation des flagelles.

L'analyse du mouvement d'autres bactéries flagellées montre que le modèle de déplacement étudié chez *E. coli* n'est pas universel (Figure 17) (Armitage and Schmitt, 1997) (Turner *et al.*, 2000) (Scharf, 2002).

Par exemple, bien que *S. meliloti* produise également plusieurs flagelles péritriches, elle n'effectue pas de période d'arrêt pour se réorienter. Les flagelles de *S. meliloti* ne tournent que dans le sens horloger et la réorientation s'effectue grâce à un changement de vitesse de rotation des flagelles (Scharf, 2002) (Schmitt, 2002) (Attmannspacher *et al.*, 2005). De même, *R. sphaeroides* change la vitesse de rotation de son flagelle pour se réorienter (Figure 17) (Packer *et al.*, 1997) (Armitage *et al.*, 1999).

3.2. Le chimiotactisme : le moyen

Le système du chimiotactisme permet à la bactérie de sentir le milieu environnemental et provoque une réponse par un changement de rotation des flagelles (Figure 18) (Wadhams and Armitage, 2004). C'est ce système qui permet à la bactérie de fuir un environnement néfaste et s'approcher d'un environnement favorable (Kentner and Sourjik, 2006).

Le système du chimiotactisme est l'un des systèmes de transduction du signal le plus étudié et le mieux compris à l'heure actuelle en biologie (Figure 18) (Butler and Camilli, 2005) (McAdams *et al.*, 2004).

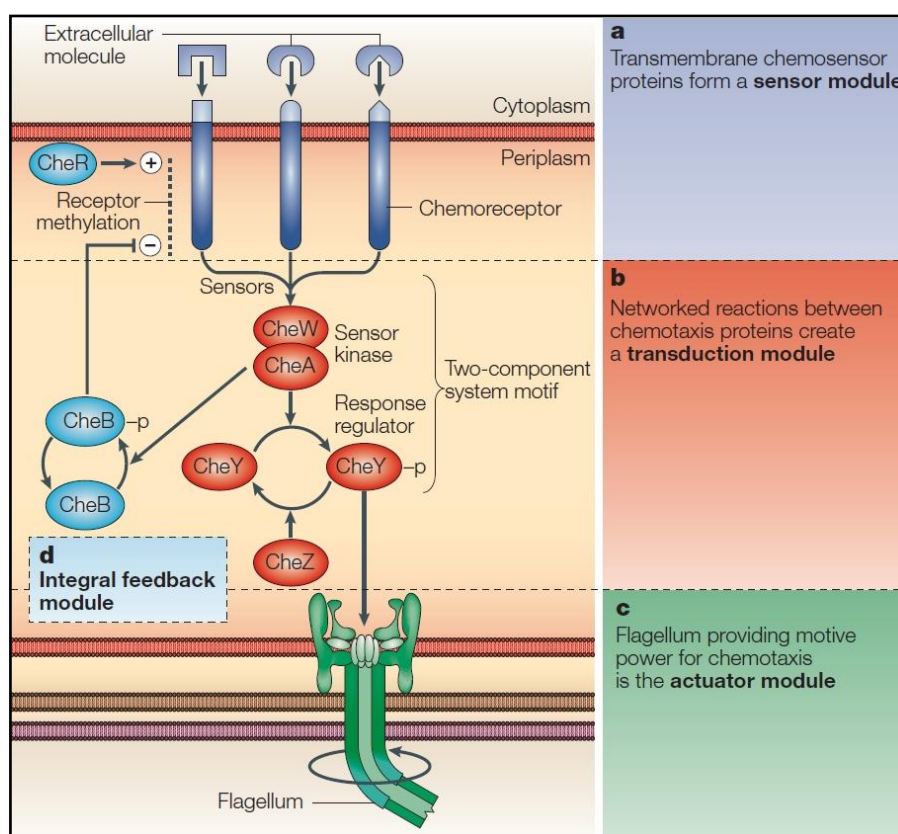


Figure 18 : Diagramme du système du chimiotactisme. Le système du chimiotactisme peut être considéré comme un réseau regroupant plusieurs modules. Ce réseau est composé (a) d'un module « senseur » formé par des récepteurs transmembranaires qui vont « sentir » les messagers chimiques externes, (b) un module de transduction du signal qui reçoit l'information des récepteurs et la traite pour la transmettre (c) au module de réaction qui est le flagelle bactérien. (d) Un module supplémentaire de contrôle de rétroaction permet de stabiliser le système (McAdams *et al.*, 2004).

Ce système est composé d'un complexe récepteurs-kinases organisé en groupe à un pôle de la bactérie. Ce complexe sent les stimuli produits par des chimio-effecteurs et transmet le signal au moteur flagellaire par phosphorylation de régulateurs de réponses diffusibles (Sourjik, 2004).

Pour commencer, la bactérie détecte certaines molécules de l'environnement. Ces composés sont dits « attractant » s'ils sont favorables pour la bactérie, ou « répulsif » si au contraire ils sont néfastes. Des récepteurs transmembranaires qui reconnaissent ces composés sont situés au pôle de la bactérie. Ces récepteurs ont donc un rôle de « senseurs » de l'environnement. Ceux-ci sont aussi appelés MCP (Methyl-acccepting Chemotaxis Proteins) car ils vont subir une série de méthylation ou de déméthylation à leur face cytoplasmique.

Lors du contact avec un attractant ou un répulsif, le MCP change de conformation, ce qui modifie son interaction avec les autres partenaires cytoplasmiques du système du chimiotactisme.

La protéine adaptatrice CheW et l'histidine kinase CheA sont en contact direct avec le MCP et réagissent au changement de conformation de celui-ci. Lors de la liaison d'un attractant au MCP, l'activité d'auto-phosphorylation de CheA est inhibée. Par contre, elle est amplifiée lors de la liaison avec un répulsif.

Une fois phosphorylée, CheA transfère rapidement son groupement phosphoryl au régulateur de réponse CheY. Le régulateur phosphorylé (CheY-P) interagit avec le moteur flagellaire par liaison avec la protéine FliM (dans l'anneau C) et change le sens de rotation d'un sens anti-horloger au sens horloger, provoquant ainsi un arrêt de la bactérie et une réorientation (Toker and Macnab, 1997).

Pour réajuster le comportement de la bactérie face aux changements perpétuels de l'environnement, le système dispose aussi d'un module de contrôle (Figure 18d). La phosphatase CheZ assure un recyclage rapide de CheY-P par déphosphorylation (McEvoy *et al.*, 1999). Ensuite, ce système va agir sur le MCP par méthylation ou déméthylation (assuré respectivement par la méthylase CheR et la méthylestérase CheB).

Lorsqu'il y a moins d'attractant dans le milieu, le nombre de liaison d'attractant au MCP diminue, ce qui a pour effet de stimuler l'auto-phosphorylation de CheA et donc la phosphorylation de CheY. Cela provoque une augmentation de la concentration de CheY-P et augmente la fréquence de changement du sens de rotation du moteur. Cela a pour conséquence finale d'augmenter le comportement de réorientation de la bactérie.

Cependant, ce phénomène a aussi pour conséquence d'augmenter la phosphorylation de la méthylestérase CheB, et donc d'augmenter la déméthylation du MCP. Au final, l'auto-phosphorylation de CheA diminue, l'activation du moteur également, et le système récupère sa stabilité de départ.

Dans le cas d'une augmentation de la concentration d'un attractant dans le milieu, l'auto-phosphorylation de CheA est inhibée, ce qui réduit la concentration de CheY-P et donc la fréquence du changement de direction du moteur flagellaire. Le nombre de réorientation de la bactérie diminue et elle nage donc plus longtemps. De plus, la phosphorylation de CheB va également être réduite, ce qui permet à la méthyltransférase CheR d'augmenter la méthylation du MCP. Cela stimule l'auto-phosphorylation de CheA et rétablit le niveau de départ et la fréquence normale du changement de direction.

En résumé, le mouvement de la bactérie dépend en permanence de l'équilibre méthylation/déméthylation du système dynamique du chimiotactisme.

Bien que le principe de chimiotactisme soit similaire chez d'autres bactéries, les récentes études indiquent que le schéma de régulation peut être encore plus complexe (Wadhams and Armitage, 2004). En exemple, et sans entrer dans les détails, *S. meliloti*, *R. sphaeroides* et *V. cholerae* possèdent plusieurs régulateurs de réponses CheY (Schmitt, 2002), (Porter *et al.*, 2006) (Riepl *et al.*, 2008) (Boin *et al.*, 2004) (Butler and Camilli, 2005).

4. Régulation de l'assemblage du flagelle en différentes classes

La production et le fonctionnement du flagelle fait intervenir plus de 60 gènes chez *S. typhimurium* (Frye *et al.*, 2006). La quantité de flagelline produite peut représenter jusqu'à 8% de la production protéique totale de la bactérie (Zhao *et al.*, 2007). L'énergie ainsi déployée pour le système flagellaire est d'environ 2% de l'énergie totale de la bactérie (Macnab, 1996).

Dans ce contexte, il n'est pas étonnant que les bactéries aient développé un système de régulation complexe pour contrôler l'expression des gènes flagellaires et la production de protéines flagellaires. Nous allons développer ici certains mécanismes de régulation sur la production et le fonctionnement du système flagellaire.

4.1. Le paradigme des 3 classes

La régulation du système flagellaire a tout d'abord été étudiée chez les entérobactéries *S. typhimurium* et *E. coli* (Macnab, 1996). Ces études ont montré que l'expression des gènes flagellaires s'exécute de manière hiérarchique originellement classé en 3 niveaux (Les classes I, II et III) (Kutsukake *et al.*, 1990).

Les gènes du niveau supérieur ne pouvant être exprimés que si les gènes du niveau précédent sont préalablement exprimés. Ces classes suivent l'ordre chronologique d'assemblage des pièces flagellaires, du corps basal au filament (Kalir *et al.*, 2001) (voir point 2).

L'activateur de l'expression des gènes flagellaires est situé dans la classe I. Les gènes *flhD* et *flhC* encodent un complexe hexamérique FlhD₄C₂ qui active la transcription des gènes flagellaires de classe II (Wang *et al.*, 2006).

Les gènes de classe II comprennent tous les gènes de structure du corps basal, du coude, mais aussi du facteur sigma FliA et de son anti-activateur FlgM. Pour terminer, les gènes de classe III comprennent les gènes de structure du filament et les gènes du système du chimiotactisme qui permettra à la bactérie de se diriger lors de son déplacement (Chilcott and Hughes, 2000) (Kalir *et al.*, 2001). L'ordre d'expression des gènes flagellaires est donc couplé à l'assemblage du flagelle (Chilcott and Hughes, 2000).

Le passage de l'expression des gènes de classe II aux gènes de classe III est contrôlé par le facteur sigma FliA et dépend du niveau d'assemblage de la structure flagellaire (Liu and Matsumura, 1995) (Chilcott and Hughes, 2000). Le facteur sigma FliA active l'expression des gènes classe III. Cependant, lors de l'expression des gènes de classe II, l'anti-activateur FlgM est également produit. FlgM se lie à FliA et l'empêche d'activer les gènes de classe III (Hughes and Mathee, 1998). FlgM joue également un rôle de chaperonne en protégeant FliA de la protéolyse et en facilitant sa sécrétion (Barembuch and Hengge, 2007) (Aldridge *et al.*, 2006b).

Une fois le coude assemblé, FlgM est sécrétée dans le milieu, libérant FliA. L'assemblage du coude permet donc l'activation de FliA et la transcription des gènes de classe III (Figure 19) (Karlinsky *et al.*, 2000). Grâce à ce point de contrôle, les gènes de la flagelline ou de tout autre produit protéique nécessaire après la formation du coude ne sont transcrits que lorsque le corps basal et un moteur fonctionnel sont présents (Chevance and Hughes, 2008).

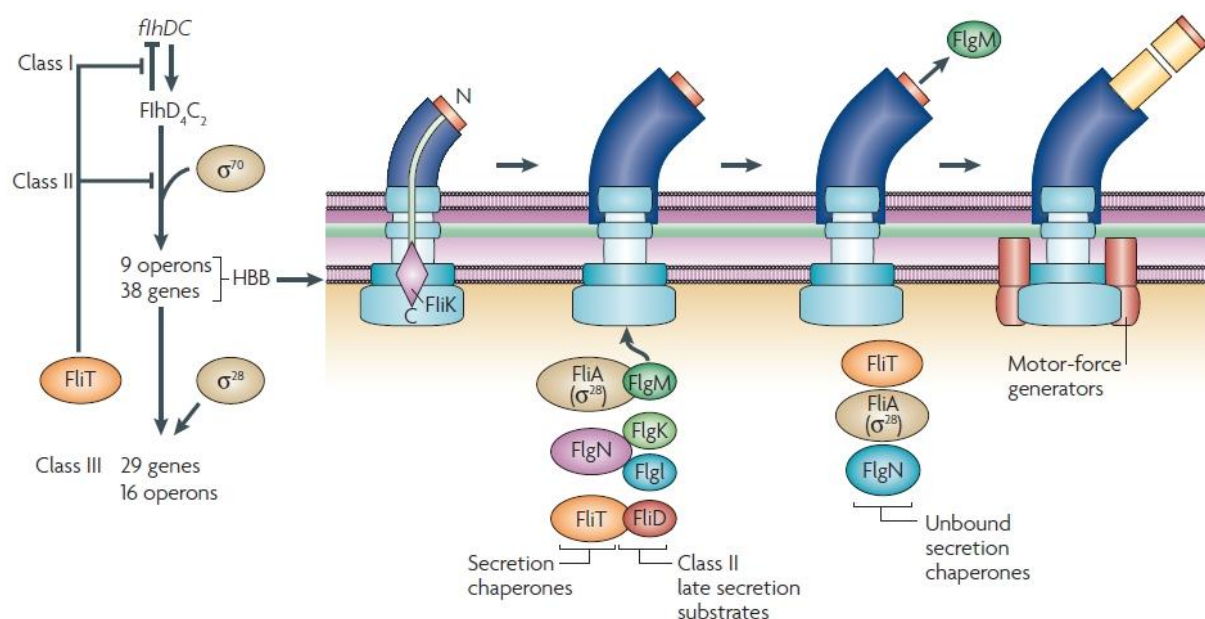


Figure 19 : Régulation de l'assemblage du flagelle avec un schéma du point de contrôle entre la classe II et la classe III. L'induction de l'opéron de classe I *flhDC* produit le complexe FlhD₄C₂ qui active la transcription des gènes de classe II dépendant du facteur sigma 70 et inhibe sa propre transcription. Les gènes de classes II comprennent les gènes d'assemblage et de structure du corps basal et du coude. Après l'assemblage du corps basal et du coude, les dernières protéines flagellaires vont être sécrétées en dehors de la bactérie et leurs chaperonnes vont être relâchées. La libération du sigma 28 (FliA) active la transcription des gènes de classe III comprenant les gènes de structure du filament et les gènes du système du chimiotactisme (Chevance and Hughes, 2008). La taille du coude est contrôlée par la protéine FliK.

Cependant, les découvertes de ces dernières années montrent que la régulation de l'assemblage du flagelle est encore plus complexe qu'initialement présenté (Barembuch and Hengge, 2007) (Chilcott and Hughes, 2000) (Brown *et al.*, 2008). En effet, la représentation en 3 classes (ou 3 niveaux) des gènes flagellaires est régie par les promoteurs des opérons flagellaires. En général, les gènes d'une même classe font partie d'un même opéron.

Néanmoins, cette classification peut prêter à confusion car certains gènes peuvent être reconnus par des promoteurs de classes différentes (Chilcott and Hughes, 2000). De plus, d'autres points de régulation à différents niveaux de la cascade de régulation ont été découverts. Par exemple, au premier niveau de régulation, FlhDC s'autorégule et inhibe sa propre transcription (Kutsukake, 1997).

Pour pouvoir passer par le flagelle, les protéines doivent être sécrétées dans un état non replié. Pour éviter d'être repliées dans le cytoplasme avant leur export, certaines chaperonnes les aident à garder un état déplié (Fraser *et al.*, 1999).

Parmi ces chaperonnes, FliT empêche le dépliement de la protéine FliD (nécessaire à la formation du filament) (Fraser *et al.*, 1999). Cependant, FliT agit également comme un anti-activateur de FlhDC (Figure 19) (Yamamoto and Kutsukake, 2006). Avant l'assemblage du coude, FliD est retenu dans la bactérie. La liaison de FliT avec FliD empêche FliT de se lier à FlhC, ce qui permet au complexe FlhD₄C₂ d'activer l'expression des gènes de classe II.

Une fois le coude assemblé, FliD est sécrétée pour permettre la formation du filament. A ce moment, FliT est libéré et se lie à FlhC pour arrêter l'expression des gènes de classes II (Kutsukake *et al.*, 1999) (Yamamoto and Kutsukake, 2006).

Ce schéma se complexifie, car en empêchant l'action de FlhDC, FliT empêche également FlhDC de s'auto-inhiber. Cela permet de restaurer la transcription des gènes de classe I (Chevance and Hughes, 2008). Dans ce système, la fin du cycle transcriptionnel flagellaire (l'activation des gènes de classe III par FliA) coïncide avec ré-initiation du cycle et la transcription des gènes de classe I (Figure 19) (Chevance and Hughes, 2008).

Cet exemple montre comment un schéma de régulation qui semblait à l'origine simple s'est complexifié au fil des récentes découvertes, faisant de cette minuscule structure flagellaire une machine extrêmement compliquée (Brown *et al.*, 2008).

4.2. Un autre modèle en 4 classes : le cas *Caulobacter crescentus*

L'étude de la régulation du système flagellaire a commencé avec les modèles *E. coli* et *S. typhimurium* (Macnab, 1996). Cependant, la disponibilité sans cesse croissante de génomes bactériens a permis d'étudier la régulation flagellaire chez d'autres espèces bactériennes.

De manière surprenante, le paradigme de régulation en 3 classes chez les entérobactéries dirigé par FlhDC n'est pas conservé parmi un grand nombre d'espèces bactériennes (McCarter, 2006).

Caulobacter crescentus est une autre bactérie de référence dans l'étude du système flagellaire (Wu and Newton, 1997) (England and Gober, 2001). Cette bactérie aquatique possède un cycle de développement composé d'une division asymétrique donnant deux types morphologiques différents (Jenal, 2000). Une bactérie issue de cette division sera immobile et munie d'un pied qui lui permettra de s'ancrer à une surface. L'autre bactérie issue de cette division sera munie d'un flagelle polaire et mobile, ce qui lui permettra de se diriger vers un autre environnement (Figure 20) (Skerker and Laub, 2004).

Contrairement au modèle entérobactérien, *C. crescentus* possède 4 classes de gènes et deux points de contrôle différents. L'expression du flagelle est liée au cycle cellulaire par le régulateur de classe I CtrA (Laub *et al.*, 2000) (Laub *et al.*, 2002) (McAdams and Shapiro, 2003). Ce régulateur remplace le complexe FlhD₄C₂ des entérobactéries.

Une fois phosphorylé, CtrA-P active l'expression des gènes de classe II comprenant les gènes de l'anneau MS, de l'anneau C, du système d'exportation et le régulateur FlbD. FlbD est l'activateur des gènes de classe III et IV, et un inhibiteur des gènes de classe II. Il s'agit du premier point de contrôle qui diffère du système entérobactérien.

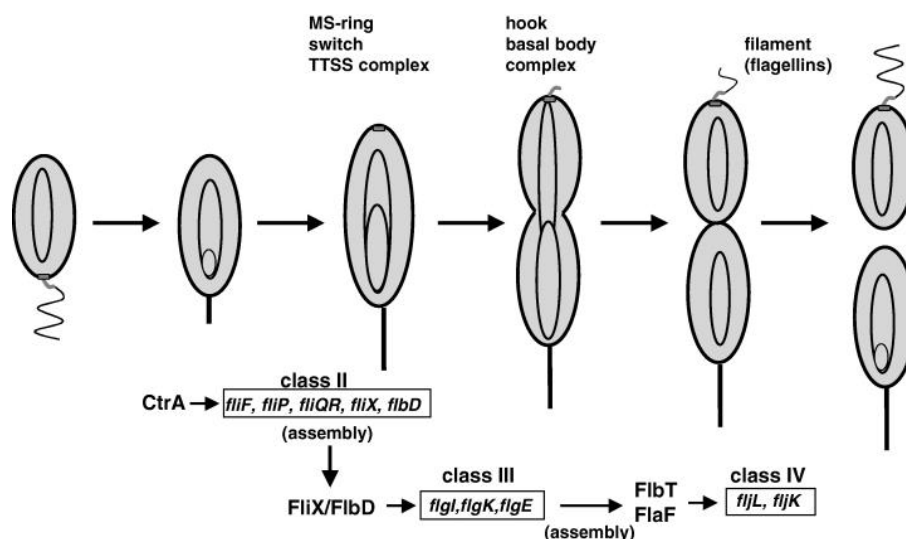


Figure 20 : Hiérarchie de régulation flagellaire en 4 classes de *C. crescentus*. La bactérie flagellée mobile se différencie d'abord en une bactérie immobile en perdant son flagelle et en initiant la production d'un pied et la synthèse d'ADN chromosomique (indiqué par la lettre grecque θ dans la bactérie). Ces événements déclenchent une cascade de régulation flagellaire qui contrôle l'expression temporelle des gènes flagellaires nommés dans les cadres en dessous de la représentation schématique de *C. crescentus* (une partie seulement des 50 gènes flagellaires est représentée). L'activation du régulateur transcriptionnel CtrA amorce l'expression des gènes de classe II (comprenant les gènes de l'anneau MS, du système de sécrétion, de l'anneau C et des régulateurs FlbD et FliX). L'assemblage de la structure encodée par les gènes de classe II est nécessaire pour la transcription des gènes de classe III (encodant la tige, les anneaux P et L, le coude) et de classe IV (encodant les flagellines). Un autre point de contrôle lie la fin de l'assemblage du coude à l'expression des gènes encodant les flagellines. Dans ce système, FliT se lie à l'ARNm de la flagelline et inhibe sa traduction jusqu'à ce que le coude soit totalement assemblé. Le gène *flaF* est également nécessaire à l'expression des flagellines (Llewellyn *et al.*, 2005).

Cependant, comme chez les entérobactéries, l'assemblage de la structure est couplé à l'expression des gènes flagellaires.

En absence d'une structure encodée par les gènes de classe II, le régulateur FliX réprime l'activité de FlbD jusqu'à ce que la première partie du corps basal soit produite (Mohr *et al.*, 1998) (Muir and Gober, 2002) (Muir and Gober, 2004). FliX réprime FlbD grâce à une interaction directe et forme un complexe qui empêche FlbD d'activer la transcription (Dutton *et al.*, 2005).

Lorsque la première partie du corps basal est assemblée, FliX cesse d'inhiber FlbD et active l'expression des gènes de classe III comprenant les gènes de la tige, des anneaux P et L,

du coude, et des gènes de classe IV comprenant les flagellines FljJ, FljK et FljL. La mutation des gènes de classe II ou III inhibe la production de flagelline (classe IV).

Un deuxième point de contrôle important est situé entre les gènes de classe III et les gènes de classe IV (les flagellines) (Anderson and Newton, 1997). Contrairement à ce qui est présenté chez les entérobactéries, le contrôle ne s'exerce plus à un niveau transcriptionnel mais à un niveau post-transcriptionnel et traductionnel.

Les protéines FlbT et FlaF sont deux régulateurs post-transcriptionnels qui se fixent sur l'ARNm des flagellines (Figure 21). Tant que la structure flagellaire n'est pas assemblée jusqu'au coude, FlbT se lie à la partie 5'UTR non traduite de l'ARNm de la flagelline et le déstabilise. FlbT modifie la structure secondaire de l'ARNm en se liant à une région de l'ARNm qui forme une boucle. Cette boucle serait importante pour stabiliser la structure secondaire de l'ARNm qui favorise la traduction (Anderson and Gober, 2000). La liaison de FlbT empêche donc la traduction de l'ARNm et la production de flagelline.

Une fois que le coude est assemblé, le régulateur FlaF agit comme un antagoniste de FlbT en favorisant la traduction de la flagelline (Llewellyn *et al.*, 2005). L'action de FlaF permet donc de terminer l'assemblage du flagelle de *C. crescentus*.

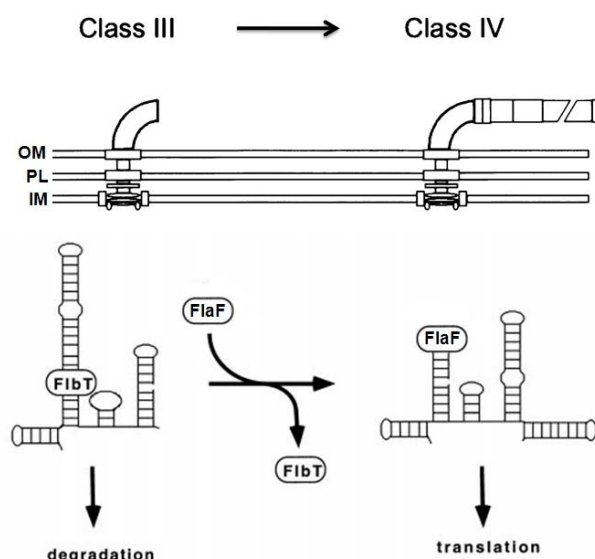


Figure 21 : Schéma du deuxième point de contrôle entre les gènes de classe III et IV chez *Caulobacter crescentus*. La partie supérieure de la figure représente les étapes d'assemblage du flagelle entre la classe III et IV. FliB se lie à la région 5' non traduite du transcrit *fljK* et active sa dégradation en stabilisant une structure secondaire qui favorise l'action des ribonucléases. Lorsque la structure est assemblée jusqu'au coude, il est possible que FliA remplace FliB sur le transcrit et engendre une structure secondaire qui permet la traduction de l'ARNm de la flagelline FliK. L'action de FliA permet l'assemblage final du flagelle par assemblage du filament. Figure modifiée (Anderson and Gober, 2000).

4.3. Les autres systèmes flagellaires en 4 classes : *Pseudomonas aeruginosa* et *Helicobacter pylori*

D'autres systèmes flagellaires en 4 classes différents du modèle de *C. crescentus* ont également été découverts récemment. A titre d'exemple, nous décrirons ici brièvement le système de régulation de *Pseudomonas aeruginosa* et *Helicobacter pylori* (Dasgupta *et al.*, 2003) (Niehus *et al.*, 2004). Remarquons que la différence majeure entre les différents systèmes est la spécificité des régulateurs flagellaires. Ceux-ci sont très variables d'une espèce à l'autre (McCarter, 2006).

Par exemple, chez *P. aeruginosa*, FleQ est le régulateur transcriptionnel de classe I qui contrôle l'expression des gènes de classe II encodant le moteur, le corps basal, le système de sécrétion et les régulateurs FlhF, FleN, FleR et FleS (Arora *et al.*, 1997) (Figure 22).

FlhF est requis pour la localisation polaire du flagelle (Pandza *et al.*, 2000). FlhF serait initialement présent au pôle de la bactérie et ciblerait l'assemblage du flagelle à cet emplacement (Dasgupta *et al.*, 2003). FleN inhibe l'activité de FleQ et permet de maintenir la production d'un seul flagelle au pôle en diminuant la synthèse des protéines flagellaires (Dasgupta *et al.*, 2000) (Dasgupta and Ramphal, 2001) (Dasgupta *et al.*, 2003).

Le point de contrôle du passage des gènes de classe II aux gènes de classe III est dirigé par le régulateur transcriptionnel FleR et sa kinase FleS. Une fois phosphorylé par FleS, FleR-P active l'expression des gènes de classe III encodant les protéines de la tige, de l'anneau L et du coude.

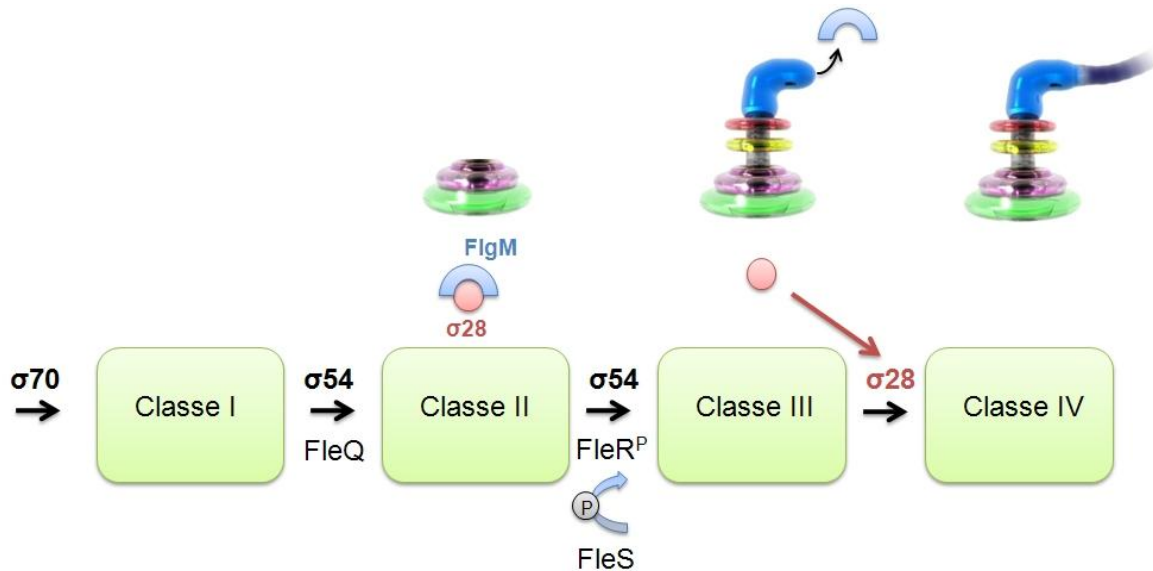


Figure 22 : Schéma de régulation en 4 classes de *Pseudomonas aeruginosa* d'après Dasgupta (Dasgupta *et al.*, 2003). Représentation du stade de formation de la structure flagellaire en haut et représentation schématique de la hiérarchie en bas. Explication voir texte.

Le deuxième point de contrôle entre les gènes de classe III et IV est similaire au système utilisé par les entérobactéries et utilise le régulateur FliA et FlgM (Frisk *et al.*, 2002). Une fois le coude assemblé, FlgM est sécrété et FliA active l'expression des gènes encodant la flagelline et le système du chimiotactisme.

Contrairement aux modèles cités précédemment qui utilisent le facteur sigma 70 pour l'expression des premières classes de gènes, les gènes de classe II et III sont tous activés grâce au facteur sigma 54 (RpoN) (Jyot *et al.*, 2002) (Dasgupta *et al.*, 2003). Notons aussi que ce schéma de régulation semble similaire chez *Legionella pneumophila*, *Vibrio cholerae* et *Vibrio fischeri* (Jacobi *et al.*, 2004) (Klose and Mekalanos, 1998) (Millikan and Ruby, 2003).

Un système particulier de régulation flagellaire existe aussi chez *H. pylori* (O'Toole *et al.*, 2000). Le profil transcriptionnel d'*H. pylori* présente une cascade de régulation composée de 3 classes et d'une classe intermédiaire (Niehus *et al.*, 2004) (Figure 23).

Contrairement aux autres modèles, il n'y a pas de régulateur de classe I identifié et il semblerait que les premiers gènes flagellaires soient exprimés constitutivement. Dans ce contexte, les gènes de classe I regroupent les gènes de la structure flagellaire jusqu'au coude, certains régulateurs, et plus surprenant, les gènes du système du chimiotactisme (Niehus *et al.*, 2004).

Les gènes de classe II comprennent les gènes de la tige, du coude, du filament mais aussi des protéines de la gaine flagellaire. Le régulateur transcriptionnel FlgR est dépendant du facteur sigma 54 et contrôle l'expression des gènes de classe II (Pereira *et al.*, 2006).

FlgR active aussi les gènes situés dans une classe intermédiaire. Cette classe de gènes est régulée par plusieurs facteurs sigma différents (Sigma 80, 54 et 28) et contient des gènes de structure et des régulateurs. Les gènes de FliA et FlgM font partie de cette classe. Comme dans les autres systèmes décrits, FliA active l'expression des gènes de classe III contenant entre autres la flagelline FlaA.

Notons que deux protéines du corps basal, FlhA et FlhF, ont un profil similaire à ce que nous avons qualifié de classe I. En effet, la mutation de FlhA et FlhF engendre une diminution de l'expression de tous les gènes de classe II et III (Niehus *et al.*, 2004).

L'intervention de 3 facteurs sigma différents dans la régulation du flagelle d'*H. pylori* est aussi une particularité. Les gènes de classe I et des gènes de la classe intermédiaire sont activés par le facteur sigma 80. Les gènes de classe II sont contrôlés par le facteur sigma 54 et les gènes de classe III par le facteur sigma 28 (Niehus *et al.*, 2004).

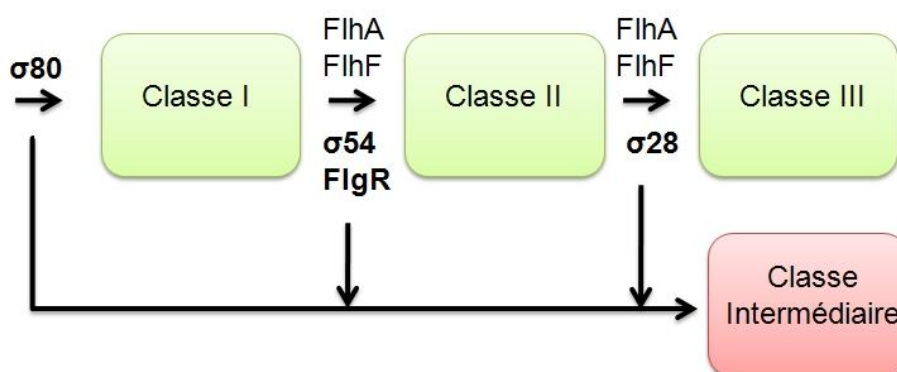


Figure 23 : Schéma de régulation en 4 classes du flagelle d'*Helicobacter pylori*. En absence de gène de classe I encodant un régulateur, la classe I comprend en partie des gènes encodant la structure du corps basal (dont FlhA), le moteur, le système du chimiotactisme et les régulateurs FlgR, FlgS et le sigma 54 (RpoN). Les gènes de classe II sont exprimés par FlgR associé au facteur sigma 54. Ceux-ci comprennent des gènes de structure encodant la tige, le coude, la flagelline FlaB et la gaine du flagelle. Le facteur sigma 28 (FliA) active l'expression des gènes de classe III comprenant par exemple le gène de la flagelline FlaA. La classe intermédiaire comprend des gènes régulés par différents facteurs sigma. Les gènes de FlgM, FliA ou FlhF se retrouvent dans cette classe. Figure dessinée à partir du schéma de Sandrine Léonard (Léonard, 2005).

Ce schéma de régulation flagellaire est également similaire chez la bactérie *Campylobacter jejuni* (Hendrixson and DiRita, 2003) (Wosten *et al.*, 2004) (Carrillo *et al.*, 2004) (Joslin and Hendrixson, 2008).

4.4. Quand les flagelles s'emmêlent : Le cas *Vibrio* spp

La complexité des systèmes flagellaires étudiés peut également s'accroître par la présence de deux systèmes flagellaires différents.

Par exemple, *Vibrio parahaemolyticus* possède un système flagellaire produisant constitutivement un unique flagelle polaire recouvert d'une gaine, mais également un deuxième système flagellaire produisant plusieurs flagelles latéraux (McCarter, 2001) (Stewart and McCarter, 2003).

Lorsque la bactérie est présente dans un milieu liquide, elle produit un flagelle polaire qui lui permet de nager. Par contre, lorsqu'elle croît sur un milieu solide ou visqueux, elle produit une multitude de flagelles latéraux non gainés et plus fragiles qui lui permettent de se déplacer plus facilement (McCarter, 2001). Le mode de déplacement est appelé respectivement le « swimming » et le « swarming » (Harshey, 2003) (Fraser and Hughes, 1999).

Au niveau de la régulation, les deux systèmes flagellaires sont également différents. Le système polaire est constitué de 4 classes et se rapproche du système de *P. aeruginosa* alors que le système latéral est composé de 3 classes (Figure 24) (McCarter, 2001) (Merino *et al.*, 2006).

Ces deux systèmes possèdent chacun leurs propres gènes. Tous les gènes du flagelle polaire sont sur le premier chromosome alors que tous les gènes des flagelles latéraux sont sur le deuxième chromosome (Makino *et al.*, 2003).

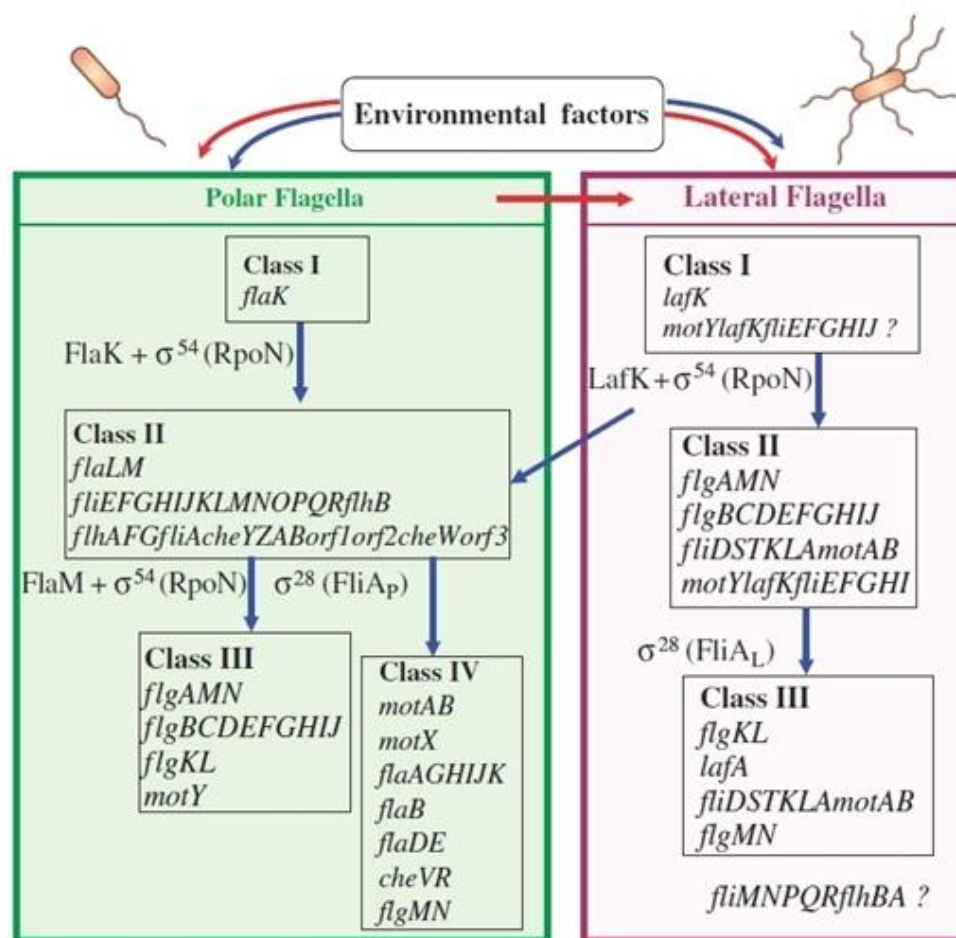


Figure 24 : Schéma de la cascade de régulation des deux systèmes flagellaires de *Vibrio parahaemolyticus*. Le cadre vert regroupe les gènes du système flagellaire polaire, et le cadre bordeaux celui des gènes du système flagellaire latéral. Les flèches bleues indiquent une activation et les flèches rouges une inhibition. La transcription de certains groupes de gènes latéraux marqué par (?) restent à élucider. Figure modifiée (Merino *et al.*, 2006).

Le système polaire de *V. parahaemolyticus* est dirigé par le régulateur transcriptionnel FlaK dépendant du facteur sigma 54. Ce régulateur est homologue aux régulateur de classe I FleQ de *P. aeruginosa* et FlrA de *V. cholerae* (Kim and McCarter, 2004).

Par contre, le système flagellaire latéral de *V. parahaemolyticus* est dirigé par le régulateur LafK. LafK dépend du facteur sigma 54 et est homologue au régulateur FlaK du système polaire (Kim and McCarter, 2004). Cependant, tout comme chez les entérobactéries, les gènes de classe III du système latéral sont aussi contrôlés par FliA (Stewart and McCarter, 2003).

Bien que les deux systèmes disposent de leurs propres gènes, des interférences existent entre les deux. Par exemple, le régulateur LafK du système latéral est capable de remplacer FlaK dans le contrôle du système polaire (Kim and McCarter, 2004). Cependant, l'inverse n'est pas possible. Seuls les gènes du chimiotactisme sont présents en un seul exemplaire et partagés par les deux systèmes (Kim and McCarter, 2004) (Sar *et al.*, 1990).

Une autre différence entre les deux systèmes est le fonctionnement du moteur flagellaire. Le moteur du système latéral fonctionne grâce aux protons par homologie avec les entérobactéries. Par contre, le moteur du système polaire utilise les ions de sodium Na^+ et possède deux protéines supplémentaires, MotX et MotY (Yorimitsu and Homma, 2001) (Figure 5b).

Pour terminer, notons que d'autres bactéries disposent de deux systèmes flagellaires différents comme certaines espèces d'*Aeromonas*, *Rhodospirillum centenum* et *Azospirillum brasilense* (Canals *et al.*, 2006b) (Canals *et al.*, 2006a) (Merino *et al.*, 2006).

Une autre découverte surprenante est la présence d'un deuxième système flagellaire chez *Escherichia coli*, *Rhodobacter sphaeroides*, *Yersinia enterocolitica* et *Bradyrhizobium japonicum* (Ren *et al.*, 2005) (Poggio *et al.*, 2007) (Bresolin *et al.*, 2008) (Liu and Ochman, 2007a) (Kanbe *et al.*, 2007).

En conclusion, il semblerait que la présence d'un deuxième système flagellaire chez les bactéries ne soit pas anodine et même sous-estimée (Ren *et al.*, 2005).

5. Evolution des systèmes flagellaires

La complexité de la structure flagellaire a poussé certains créationnistes américains à y voir l'œuvre de Dieu. Pour eux, la complexité d'un tel système chez une bactérie ne pouvait pas être le résultat de l'évolution mais bien d'une création divine. C'est ce que l'on a appelé aux USA l'Intelligent Design (ID). L'ID a ensuite été enseigné dans les écoles américaines.

Un procès en 2005 à Dover en Pennsylvanie a décrété que le flagelle bactérien était bien l'œuvre de l'évolution et que l'enseignement de l'ID dans les écoles américaines n'était pas constitutionnel (Pallen and Matzke, 2006) (Doolittle and Zhaxybayeva, 2007). Ce cas a poussé la communauté scientifique à publier plusieurs articles sur l'évolution des systèmes flagellaires.

La disponibilité sans cesse croissante de génomes bactériens montre que les gènes flagellaires sont répandus chez un grand nombre d'espèces différentes. On les retrouve tant chez les bactéries que chez les Archaeobactéries.

Les gènes flagellaires sont présents dans les phyla aussi divers que les Protéobactéries, les Firmicutes, les Spirochètes, les Thermotogales, les Aquifexales et les Planctomycètes (Figure 25) (Pallen *et al.*, 2005) (Snyder *et al.*, 2009).

Phylum	Genome sequences	Complete systems	Incomplete systems	Flagellar genes absent
Proteobacteria	273	191	15	67
Firmicutes	121	30	12	79
Actinobacteria	43	0	4	39
Cyanobacteria	26	0	0	26
Bacterioides-Chlorobi group	16	0	1	15
Chlamydiae-Verrucomicrobium group	11	0	0	11
Spirochaetes	9	9	0	0
Thermotogae	4	4	0	0
Chloroflexi	4	0	0	4
Deinococcus-Thermus	4	0	0	4
Fibrobacteres-Acidobacteria group	2	0	2	0
Aquificae	1	0	1	0
Planctomycetes	1	1	0	0
Fusobacteria	1	0	0	1
Total	516	235	35	246

Figure 25 : Distribution des systèmes flagellaires prédits dans les différents Phyla (Snyder *et al.*, 2009). Ce tableau montre la présence d'un système flagellaire complet (Complete systems) ou l'absence de gènes flagellaires (Flagellar genes absent). Les génomes contenant des gènes flagellaires mais ne pouvant produire une structure fonctionnelle sont annotés comme incomplets (Incomplete systems).

Certains de ces systèmes flagellaires divergent néanmoins entre les espèces. Par exemple, les régulateurs à la base de l'expression des gènes flagellaires varient énormément (voir point 4) (Soutourina and Bertin, 2003).

De nombreuses espèces de *Shigella* sont non mobiles malgré la présence de gènes flagellaires. Il s'avère que les gènes flagellaires sont parsemés de mutations qui rendent ce système inactif. Par exemple, l'opéron contenant le régulateur de classe I FlhDC est complètement déleté dans 11 souches de *Shigella* (Tominaga *et al.*, 2005).

Bien que l'endosymbionte *Buchnera aphidicola* soit une bactérie non mobile et ne possède pas de flagelline, elle possède les gènes flagellaires nécessaires à la biosynthèse du corps basal et du coude (Snyder *et al.*, 2009).

Des images en microscopie électronique montrent que la bactérie est littéralement couverte de complexes corps basal – coude (Maezawa *et al.*, 2006). Il se pourrait que le système flagellaire de *Buchnera* ait évolué pour utiliser le système flagellaire uniquement comme système de sécrétion (Moya *et al.*, 2008).

Un autre exemple de divergence est le cas du flagelle des Spirochètes. Ce flagelle est produit dans l'espace périplasmique de la bactérie et ne traverse pas la membrane externe. Une mutation du gène *flgG* (codant la partie distale de la tige) chez *Salmonella* produit un flagelle dans l'espace périplasmique comme celui des Spirochètes (Chevance *et al.*, 2007). Ce résultat suppose que l'endoflagelle des Spirochètes dériverait du flagelle des bactéries à Gram négatif et ne serait pas l'ancêtre du flagelle des bactéries (Snyder *et al.*, 2009).

Ces exemples montrent que le flagelle est non seulement présent chez un grand nombre de bactéries, mais qu'il évolue également sous la pression de sélection. De cette façon, cet ancien organelle a subi une série de modifications spécifiques aux branches évolutives des bactéries (Liu and Ochman, 2007a).

Une hypothèse émise par Liu *et al.* serait que les gènes flagellaires proviendraient d'un petit groupe de gènes précurseurs (ou d'un seul gène) provenant d'un ancêtre commun. Ce, ou ces gènes, se seraient dupliqués pour former des opérons, et la structure flagellaire que l'on connaît actuellement (Liu and Ochman, 2007b). Selon Liu *et al.*, un groupe de 24 gènes flagellaires se retrouverait dans toutes les espèces, et proviendrait d'un ancêtre commun (Figure 26).

appartenant à la famille des protéines de membrane externe, de même, des homologies sont observées entre FliI et la sous-unité β de l'ATP synthase, entre FliY et un ABC transporteur, et entre FliG et la protéine MgtE appartenant à la famille des transporteurs de magnésium (Liu and Ochman, 2007a) (Snyder *et al.*, 2009).

Tous ces exemples mettent à mal le concept d'ID et prouve que le flagelle bactérien actuel est le résultat d'une évolution complexe qui mérite d'être investiguée.

6. La flagelline

6.1. Déclaration de guerre entre hôte et pathogène

Comme nous allons le voir dans cette partie, la flagelline est un atout pour la bactérie, mais également une arme à double tranchant qui peut être aussi utilisée par l'hôte.

Pour rappel, la flagelline est la protéine qui forme le filament du flagelle bactérien (Voir point 2.3.2). Comme nous l'avons déjà signalé, le flagelle est une structure essentielle pour le pouvoir pathogène des bactéries car il leur permet de bouger et de coloniser un hôte, par exemple en envahissant les muqueuses. Une fois dans les muqueuses, le flagelle permet aux bactéries de se déplacer dans l'organisme, d'adhérer et d'envahir le site d'infection, mais aussi de sécréter des facteurs de virulence (Josenhans and Suerbaum, 2002) (Ramos *et al.*, 2004).

Cependant, l'hôte est capable de contrer cette attaque et de retourner l'arme contre son agresseur. Parmi ses moyens de défense, l'hôte peut activer son système immunitaire inné grâce à une reconnaissance spécifique extracellulaire et cytosolique de la flagelline (Miao *et al.*, 2007). La flagelline est également un antigène immunogène qui active le système immunitaire acquis et engendre la production d'anticorps anti-flagelline (Salazar-Gonzalez and McSorley, 2005). Cependant, nous n'aborderons que le cas du système immunitaire inné dans la suite de cette introduction.

6.1.1. **Le système immunitaire inné face aux microorganismes**

Pour détecter la présence de pathogènes dans l'organisme, le système immunitaire inné utilise certains récepteurs spécifiques nommés PRRs (Pattern-Recognition Receptors). Ces récepteurs déclenchent l'inflammation lorsqu'ils reconnaissent des structures conservées chez les pathogènes (nommés PAMP pour « Pathogen-Associated Molecular Patterns »).

Les TLRs (Toll-Like Receptor) sont des récepteurs membranaires qui font partie de ces PRRs (Akira and Takeda, 2004). Suite à la reconnaissance de PAMPs par les TLRs de la cellule, l'expression de certains gènes de cytokines et de chemokines va être activée pour répondre à cette agression (par exemple les gènes du TNF, IL-6 et IL-12) (Akira and Takeda, 2004).

Les TLRs activent également l'expression d'une forme immature de l'IL-1 β et IL-18. Cependant, le traitement vers une forme mature et sa sécrétion dépend de la Caspase-1 qui est activée par un autre récepteur nommé NLR (Nod-Like Receptor) (Dinarello, 1998) (Yu and Finlay, 2008). Tout comme les TLRs, Les NLRs sont des PRRs, mais ceux-ci détectent des PAMPs cytosoliques (Ting *et al.*, 2008). Les NLRs sont composés de 3 domaines : Un domaine signal amino-terminal, un domaine central d'oligomérisation et un domaine senseur carboxy-terminal (Figure 27A) (Martinon *et al.*, 2007) (Miao *et al.*, 2007).

6.1.2. Reconnaissance de la flagelline extracellulaire par le TLR5

Certaines cellules de l'hôte expriment un récepteur membranaire appelé TLR-5 (Toll-Like Receptor-5) qui reconnaît spécifiquement la flagelline (Figure 27B) (Hayashi *et al.*, 2001) (Akira and Takeda, 2004) (Ramos *et al.*, 2004) (Honko and Mizel, 2005) (Feuillet *et al.*, 2006) (Steiner, 2007). Cette reconnaissance est également possible chez les plantes via le récepteur FLS2 qui possède des homologues avec le TLR5 (Figure 27C) (Gomez-Gomez and Boller, 2002) (Asai *et al.*, 2002).

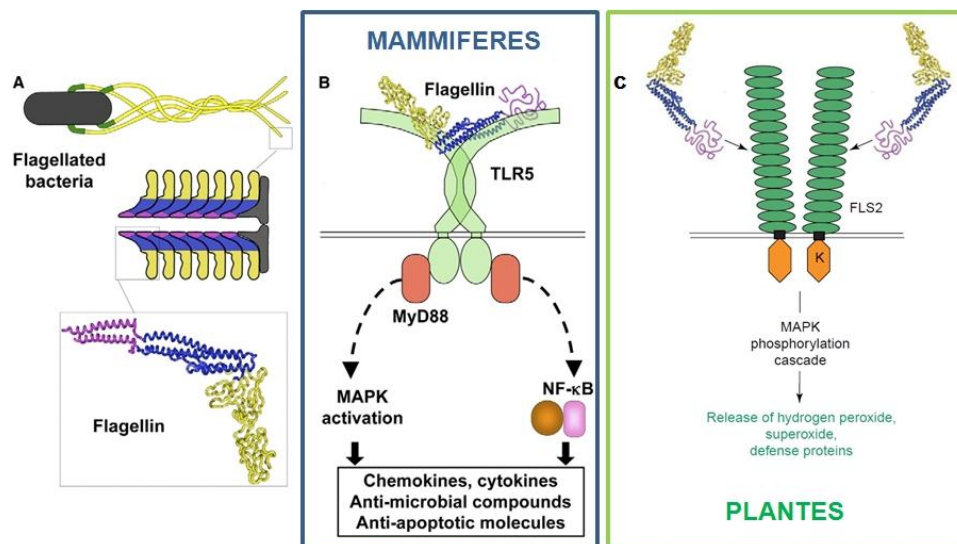


Figure 27 : Détection de la flagelline par les récepteurs TLR5 et FLS2. (A) Représentation d'une bactérie flagellée et agencement des monomères de flagelline dans le filament. Représentation schématique de l'interaction de la flagelline avec le récepteur TLR5 (B) chez les mammifères et du récepteur FLS2 (C) chez les plantes. L'interaction de la flagelline avec les récepteurs active la voie MAPK et NF-κB (Ramos *et al.*, 2004) (Rumbo *et al.*, 2006).

Le récepteur TLR5 est organisé en 3 domaines fonctionnels : un domaine extracellulaire riche en leucine (LRR) impliqué dans la reconnaissance de la flagelline, un domaine situé en membrane et pour terminer, un domaine TIR cytosolique qui transfère le stimulus à des molécules relais telle que MyD88 (Myeloid Differentiation factor 88) (Akira and Takeda, 2004). La partie de la flagelline reconnue par les TLR5 est le domaine D1 qui se situe à l'intérieur du filament (Figures 15 et 27). Le TLR5 reconnaît sans doute des monomères de flagelline non assemblés provenant par exemple d'une dépolymérisation du filament (Miao *et al.*, 2007).

Une fois la liaison de la flagelline au TLR5 établie, la cascade d'activation qui en découle active l'IκB kinase et provoque la translocation du facteur transcriptionnel NF-κB vers le noyau. Au final, plusieurs chemokines et cytokines vont être exprimées et sécrétées, comme par exemple l'IL-12 (Uematsu *et al.*, 2006) (Miao *et al.*, 2007).

6.1.3. Reconnaissance de la flagelline cytosolique par les récepteurs Ipaf et Naip5

Certaines bactéries pénètrent dans la cellule hôte et sont capables de s'y répliquer, c'est le cas des bactéries dites intracellulaires (Casadevall, 2008). Une fois dans la cellule, certaines bactéries comme *S. typhimurium* ou *L. pneumophila* sécrètent la flagelline dans le cytosol (Miao *et al.*, 2008) (Sutterwala and Flavell, 2009). La cellule est capable de reconnaître la flagelline intracellulaire puis d'activer la réponse immunitaire innée via deux récepteurs cytosoliques : Ipaf et Naip5 (Figure 28) (Sutterwala and Flavell, 2009) (Carneiro *et al.*, 2008) (Miao *et al.*, 2006) (Molofsky *et al.*, 2006) (Franchi *et al.*, 2006) (Amer *et al.*, 2006).

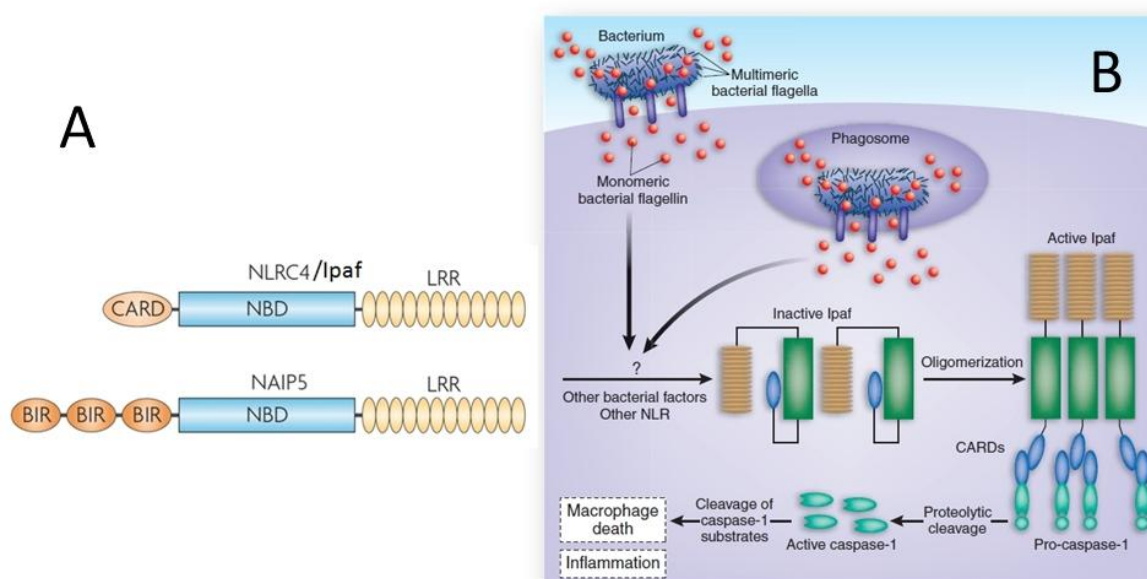


Figure 28 : Reconnaissance intracellulaire de la flagelline par les récepteurs cytosoliques Ipaf et Naip5. (A) Représentation des 3 domaines d'Ipaf (aussi appelé NLRC4) et Naip5 (Neural Apoptosis Inhibitory Protein 5). Ces protéines sont des NLRs (Nucleotide-binding domain, Leucine-rich Repart containing) qui sont activées par la flagelline et provoque une forme de mort cellulaire, appelée pyroptose, dépendant de la Caspase-1. BIR (Baculovirus Inhibitor of apoptosis Repart), CARD (Caspase Recruitment Domain), NBD (Nucleotide-binding Domain), LRR (Leucine-rich Repart) (Ting *et al.*, 2008). (B) L'infection du macrophage par *S. typhimurium*, *P. aeruginosa*, ou *L. pneumophila* requiert un système de sécrétion fonctionnel de type III ou IV (barres mauves). L'infection provoque un changement de conformation d'Ipaf par un mécanisme inconnu qui permet à Ipaf de s'oligomériser. Après l'oligomérisation, Ipaf recrute la pro-caspase-1 via une interaction des domaines CARD et active la caspase-1, ce qui provoque un clivage de la pro-IL-1 β en IL-1 β et la mort cellulaire. Au final, la mort cellulaire et l'inflammation limite la croissance des pathogènes intracellulaires (Roy and Zamboni, 2006).

6.1.3.1. Le récepteur Ipaf

Ipaf fait partie des membres de la famille des récepteurs NLR et est composé d'un domaine signal (CARD), d'un domaine NOD, et d'un domaine riche en leucine (LRR) similaire à celui des TLR5 (Figure 28A) (Miao *et al.*, 2007) (Sutterwala and Flavell, 2009).

Lors de l'infection d'une cellule, certaines bactéries peuvent sécréter de la flagelline dans le cytosol par le système de sécrétion de type III ou IV (Figure 28B) (Amer *et al.*, 2006) (Miao *et al.*, 2007) (Miao *et al.*, 2008). La flagelline présente dans le cytosol est reconnue par le récepteur cytosolique Ipaf.

Dès qu'Ipaf détecte la flagelline, il active la protéase nommée caspase-1 qui clive la proIL-1 β en sa forme mature IL-1 β . L'activation d'Ipaf va donc permettre la sécrétion IL-1 β mais aussi d'IL-18 (Miao *et al.*, 2006) (Molofsky *et al.*, 2006) (Zamboni *et al.*, 2006) (Mariathasan *et al.*, 2004) (Mariathasan and Monack, 2007).

La sécrétion d'IL-1 β induit une inflammation locale et de la fièvre, tandis que la sécrétion d'IL-18 induit l'activation des cellules Natural Killer par la sécrétion d'IFN- γ par les lymphocytes Th1 (Takeda *et al.*, 1998). Au final, la sécrétion d'IL-1 β conduira à la mort cellulaire par ce que l'on appelle une « pyroptose » (voir la revue de Fink 2005) (Fink and Cookson, 2005).

La partie de la flagelline reconnue par Ipaf est différente de celle reconnue par le TLR5. En effet, la flagelline d'*H. pylori* n'est pas reconnue par le TLR5 mais bien par Ipaf (Miao *et al.*, 2007) (Andersen-Nissen *et al.*, 2005) (Gewirtz *et al.*, 2004). Chez *P. aeruginosa*, Ipaf et TLR5 détectent également une région différente de la flagelline (Franchi *et al.*, 2007).

6.1.3.2. Le récepteur Naip5

Récemment, des études ont montré que la partie carboxy-terminale de la flagelline de *L. pneumophila* est détectée par un autre récepteur cytosolique (Ren *et al.*, 2006) (Lightfield *et al.*, 2008).

Ce récepteur nommé Naip5 (Neuronal Apoptosis Inhibitory Protein 5) active également la caspase-1 et détecterait la flagelline en coopération avec Ipaf (Miao *et al.*, 2007) (Zamboni *et al.*, 2006) (Molofsky *et al.*, 2006). Cependant, le rôle précis de Naip5 dans la détection de la flagelline nécessite d'autres études complémentaires (Miao *et al.*, 2007).

6.2. La flagelline « sucrée »

La glycosylation est un processus enzymatique qui permet l'ajout de sucres à d'autres sucres, aux lipides ou aux protéines (Marth and Grewal, 2008). Chez les eucaryotes, les protéines glycosylées sont localisées à la surface cellulaire et dans la matrice extracellulaire. Les interactions cellulaires impliquant les protéines glycosylées sont requises dans une grande variété de processus biologiques allant de la reconnaissance immunitaire au développement de cancer (Hakomori, 2002) (Szymanski and Wren, 2005).

Ce mécanisme semblait au départ spécifique au monde Eucaryote. Néanmoins, de nombreuses recherches récentes ont montré que la glycosylation est également présente chez les Archébactéries et les Bactéries (Benz and Schmidt, 2002) (Messner, 2004) (Szymanski and Wren, 2005).

Chez les bactéries, la glycosylation contribue, par exemple, au mécanisme d'adhésion ou à la protection de la bactérie contre le système immunitaire (Szymanski and Wren, 2005). Les sucres sont ajoutés à la protéine soit par « N-glycosylation » via un lien sur l'azote du groupement amide de l'asparagine, soit par « O-glycosylation » sur le groupement hydroxyle d'un résidu sérine ou thréonine (Moens and Vanderleyden, 1997).

Parmi les appendices extracellulaires sujets à la glycosylation, nous retrouvons le pili, le système de sécrétion de type IV, mais également le flagelle (Figure 29).

Au niveau du flagelle, la glycosylation intervient dans la modification post-traductionnelle de la flagelline de plusieurs bactéries comme *Campylobacter jejuni*, *Helicobacter pylori* ou *Pseudomonas syringae* et *Pseudomonas aeruginosa* (Logan, 2006) (Schirm *et al.*, 2003) (Arora *et al.*, 2001). Il est possible que la glycosylation de la flagelline soit une caractéristique unique des systèmes flagellaires de type polaire (Schirm *et al.*, 2003).

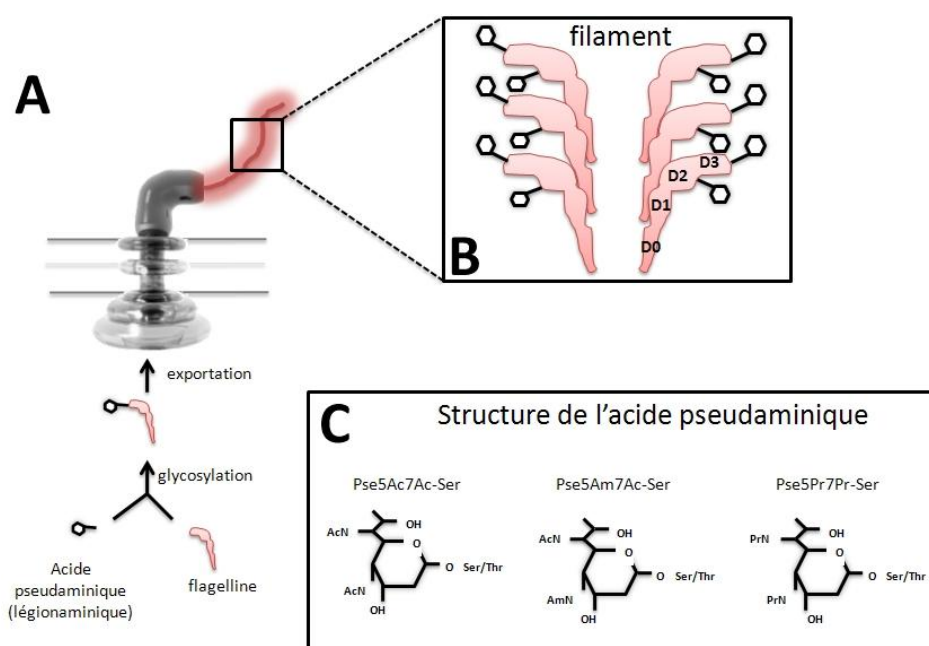


Figure 29 : Glycosylation de la flagelline. Avant d'être exportée dans le filament, les monomères de flagelline de certaines espèces bactériennes subissent une modification post-traductionnelle par la liaison de dérivés de l'acide pseudaminique ou légionaminique (A). Le ciblage des domaines D2 et D3 des monomères de flagelline par la glycosylation laisse envisager une présentation externe des sucres liés à la flagelline (B). En (C), exemple de dérivés de l'acide pseudaminique se liant à la flagelline de *C. jejuni* (Thibault *et al.*, 2001) (Power and Jennings, 2003). En rouge, monomères de flagelline et filament; hexagones blancs, représentation schématique des sucres.

La glycosylation des protéines chez la bactérie *C. jejuni* est actuellement la plus étudiée (Guerry and Szymanski, 2008). La flagelline est la première glycoprotéine découverte chez *C. jejuni* et reste jusqu'à présent la mieux caractérisée (Guerry and Szymanski, 2008). La détection de plusieurs sites de glycosylation de type « O-glycosylation » sur la flagelline a montré que celle-ci s'effectue sur le domaine D2 et D3, ce qui correspond à la face externe du filament après assemblage de la flagelline (Figure 29B). Il est donc probable que plusieurs sucres soient exposés à la surface du filament et affectent l'immunogénicité du filament (Logan *et al.*, 2002).

La glycosylation de la flagelline est également une étape importante pour l'assemblage du flagelle. Par exemple, *Campylobacter* et *Helicobacter* sont immobiles et n'assemblent pas de flagelle lorsque le processus de glycosylation est inhibé (Goon *et al.*, 2003) (Schirm *et al.*, 2003). Chez les espèces de *Pseudomonas*, bien que la glycosylation ne semble pas jouer de rôle dans l'assemblage du flagelle, elle est néanmoins nécessaire à la structure du filament (Logan, 2006) (Schirm *et al.*, 2004) (Taguchi *et al.*, 2008).

Actuellement, les dérivés de deux sucres sont connus pour modifier la flagelline par glycosylation. La glycosylation de la flagelline permet l'ajout d'un sucre à 9 carbones appelé acide pseudaminique (Pse), structuralement similaire à l'acide sialique (Figure 29C) (Schirm *et al.*, 2003). Récemment, l'acide légionaminique (Leg) a aussi été découvert pour modifier la flagelline de *Campylobacter coli* VC167 et de *Campylobacter jejuni* (McNally *et al.*, 2007) (Howard *et al.*, 2009).

Plusieurs gènes sont connus pour affecter la glycosylation de la flagelline chez *Campylobacter jejuni*, *Caulobacter crescentus*, *Aeromonas caviae*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Helicobacter pylori* (Power and Jennings, 2003) (Thibault *et al.*, 2001) (McNally *et al.*, 2006) (Leclerc *et al.*, 1998) (Gryllos *et al.*, 2001) (Schirm *et al.*, 2004) (Merkx-Jacques *et al.*, 2004) (Josenhans *et al.*, 2002). Parmi ceux-ci se trouvent plusieurs gènes encodant des enzymes de type aminotransférase, acétyltransférase ou nucléotide-sucres déshydratase. Ces gènes sont généralement présents en îlot dans le génome et sont localisés à côté de gènes flagellaires (Tabei *et al.*, 2009) (Power and Jennings, 2003). La mutation des gènes impliqués dans la glycosylation de la flagelline entraîne une production de flagelline ayant une masse moléculaire réduite par rapport à une flagelline glycosylée.

À l'heure actuelle, la compréhension du mécanisme de glycosylation des protéines bactériennes en est à ses balbutiements. Néanmoins, la découverte et l'étude de la glycosylation chez les bactéries permettra sans doute une meilleure compréhension de la glycosylation des systèmes eucaryotes et des progrès dans le développement de nouveaux antibiotiques (Szymanski and Wren, 2005).

7. La présence d'un système flagellaire chez *Brucella*

Les bactéries du genre *Brucella* sont des bactéries à coloration de Gram négatif appartenant à la famille des α -protéobactéries. Bien qu'elle puisse survivre en dehors de l'hôte, *Brucella* est une bactérie pathogène qui vit et se réplique dans les macrophages (Celli, 2006). Pour cette raison elle est dite intracellulaire facultative.

Bien que les bactéries du genre *Brucella* furent longtemps considérées comme non flagellées, le séquençage de leur génome a mis à jour la présence de tous les gènes nécessaires à la production d'un flagelle fonctionnel (Fretin *et al.*, 2005). Dans cette partie, nous présenterons *Brucella* et les découvertes sur les gènes flagellaires qui ont initié cette thèse.

7.1. Une bactérie appartenant à la classe des α -protéobactéries

Avant d'aborder la bactérie qui nous intéresse, nous allons aborder le sous-groupe auquel elle fait partie : les α -protéobactéries. Les protéobactéries sont divisées en plusieurs sous-groupes, parmi lesquels on retrouve la classe des α -protéobactéries. La classe des α -protéobactéries est le groupe de bactéries le plus représenté sur la planète (Venter *et al.*, 2004).

Il existe parmi les α -protéobactéries une très vaste variété de bactéries à coloration de Gram négatif avec des morphologies et des cycles de vie très diversifiés. On retrouve dans cette classe de nombreuses espèces bactériennes qui vivent en interaction avec un hôte eucaryote supérieur (Batut *et al.*, 2004).

Par exemple, des bactéries intracellulaires obligatoires (*Rickettsia*), des bactéries intracellulaires facultatives (*Bartonella*, *Brucella*), des bactéries extracellulaires (*Agrobacterium*) ainsi que des symbiontes de plantes et d'animaux (*Sinorhizobium*, *Wolbachia*) (Moreno *et al.*, 1990).

Notons également que la mitochondrie serait à l'origine une α -protéobactérie intracellulaire obligatoire qui aurait évolué pour devenir *in fine* un organite cellulaire à part entière (Figure 30) (Karlberg and Andersson, 2003).

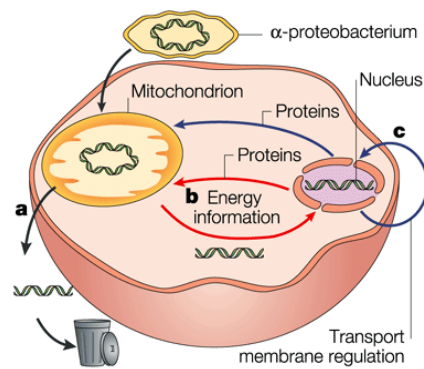


Figure 30 : Origine de la mitochondrie. Suite au réarrangement du génome d'une α -protéobactérie endosymbiotique, celle-ci se serait transformée pour donner naissance à la mitochondrie. a) Perte de gènes de l'endosymbionte. b) Certains gènes bactériens ont été transférés vers le noyau (flèches rouges). Les protéines résultantes de ces gènes sont ensuite exportées vers la mitochondrie. c) Certains gènes du noyau ont aussi évolué pour être utilisés par la mitochondrie (Karlberg and Andersson, 2003).

Grâce à la disponibilité croissante du nombre de génomes d' α -protéobactéries séquencés, nous pouvons aujourd'hui voir comment le mode de vie et l'environnement que rencontrent les bactéries influence l'organisation, la taille et l'évolution des génomes bactériens (Batut *et al.*, 2004).

Les bactéries vivant hors de l'hôte ont évolué par expansion de leur génome tandis que les bactéries intracellulaires obligatoires ont plutôt eu tendance à perdre leur matériel génomique (Boussau *et al.*, 2004) (Figure 31). L'exemple ultime est celui du génome mitochondrial qui encode une petite partie des protéines nécessaires à la fonction mitochondriale. La plus grande partie des protéines provient de la cellule hôte (Figure 30) (Karlberg and Andersson, 2003).

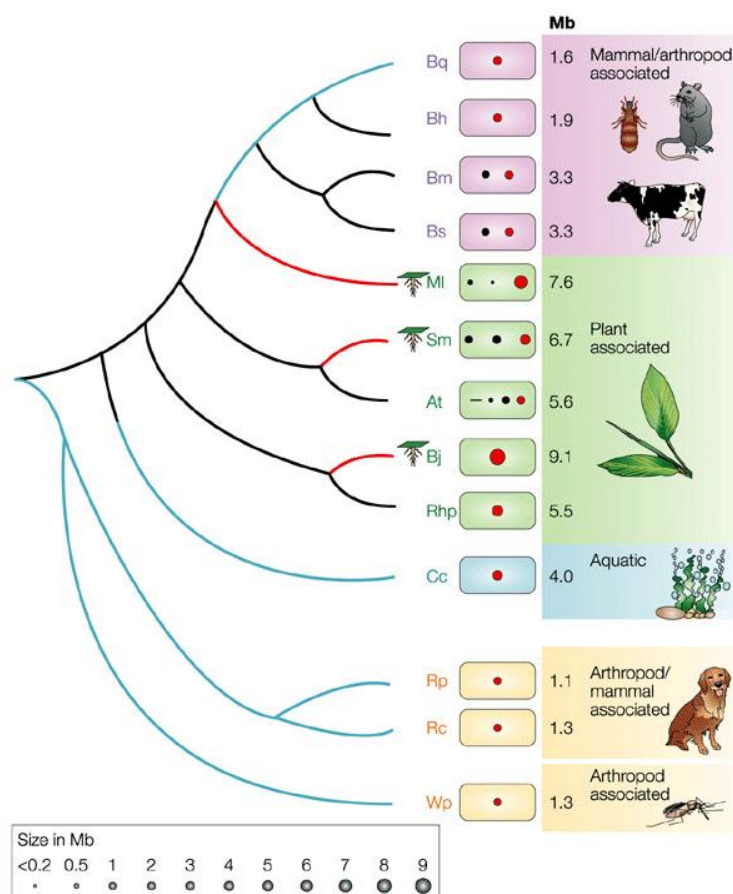


Figure 31 : Variation de la taille des génomes et du mode vie chez les α -protéobactéries. Relation phylogénétique pour 13 espèces différentes d' α -proteobactéries dont les génomes sont séquencés. Branches bleues, perte de gènes; branches rouges, gain de gènes. Les petites racines vertes représentent les bactéries fixant l'azote et qui appartiennent aux Rhizobactéries. La taille des cercles correspond à la taille relative des réplicons individuels. Le cercle rouge est le chromosome principal pour chaque espèce. *Agrobacterium tumefaciens* a un chromosome linéaire représenté par une ligne noire. At, *Agrobacterium tumefaciens*; Bh, *Bartonella henselae*; Bj, *Bradyrhizobium japonicum*; Bm, *Brucella melitensis*; Bq, *Bartonella quintana*; Bs, *Brucella suis*; Cc, *Caulobacter crescentus*; MI, *Mesorhizobium loti*; Sm, *Sinorhizobium meliloti*; Rc, *Rickettsia conorii*; Rhp, *Rhodopseudomonas palustris*; Rp, *Rickettsia prowazekii*; Wp, *Wolbachia pipientis* (Batut et al., 2004).

7.2. La brucellose : de l'animal à l'Homme

Les bactéries du genre *Brucella* sont responsables de la zoonose la plus répandue dans le monde : la brucellose. Cette maladie contamine une large variété de mammifères terrestres et aquatiques, dont l'homme.

En 1887, le médecin britannique Sir David Bruce isola une bactérie de la rate d'un soldat décédé (Godfroid et al., 2005). A cette époque, un mal mystérieux appelé « fièvre de Malte » frappait certains soldats britanniques stationnés sur l'île de Malte. Sir David Bruce

nomma le germe isolé *Micrococcus melitensis*. Ce n'est que plus tard que cette bactérie sera rebaptisée *Brucella melitensis* en son honneur.

Bien qu'elles puissent occasionnellement infecter d'autres hôtes, les bactéries du genre *Brucella* sont traditionnellement classées en neuf espèces suivant leur préférence d'hôte : *B. melitensis* (les caprins), *B. abortus* (les bovins), *B. canis* (le chien), *B. suis* (le porc), *B. ovis* (les ovins), *B. neotomae* (le rat du désert), *B. pinnipedialis* (le phoque) *B. ceti* (le dauphin) et *B. microti* (le campagnol des champs) (Dawson *et al.*, 2008) (Scholz *et al.*, 2008). Notons cependant que cette préférence d'hôte n'est pas exclusive.

Par exemple, la brucellose humaine est principalement due à *B. melitensis* mais peut être causée par *B. abortus* et *B. suis*. Des rares cas de contamination humaine par *B. canis*, ou une souche marine de *Brucella* ont aussi été décrits (Lucero *et al.*, 2005) (Godfroid *et al.*, 2005) (Sohn *et al.*, 2003).

7.2.1. La brucellose animale

La brucellose est l'une des zoonoses la plus largement représentée dans le monde. Elle touche un nombre très varié de mammifères tant terrestres que marins. Parmi les animaux touchés, on retrouve des animaux sauvages mais également des animaux domestiques.

Généralement, la maladie atteint le système génital de l'animal, causant l'avortement chez la femelle gestante et une tuméfaction des testicules chez le mâle. Cependant la maladie peut rester inapparente. D'autres organes peuvent être touchés et provoquer une inflammation (CFSPH, 2007) (OIE, 2008).

La transmission de la maladie peut se faire soit par contact direct avec l'animal contaminé (par exemple par le lait maternel) ou par contact indirect via la présence de *Brucella* dans l'environnement (lors de l'avortement les *Brucellae* sont disséminées en nombre important dans l'environnement).

Bien qu'une politique d'éradication de la maladie ait été mise en œuvre, comme le programme contre la brucellose bovine dans les pays industrialisés, la brucellose est encore très répandue (Maurin, 2005).

7.2.2. Transmission de la brucellose à l'homme

La brucellose n'est pas contagieuse chez l'homme. En effet, la contamination humaine est accidentelle et provient du contact avec des animaux d'élevage infectés (Michaux-Charachon *et al.*, 2002).

La transmission de la brucellose à l'homme se fait par la consommation de produits laitiers infectés et non pasteurisés, par un contact direct avec une partie de l'animal infecté (comme le placenta) et par inhalation d'aérosol contenant des particules infectées (Pappas *et al.*, 2005). Les cas de contaminations interhumaines sont très rares mais peuvent se produire accidentellement lors de l'allaitement ou de l'accouchement lorsque la mère est contaminée (Tikare *et al.*, 2008) (Mesner *et al.*, 2007).

7.2.3. Signes cliniques chez l'homme

Il arrive souvent que la brucellose humaine soit asymptomatique. Cependant, la maladie peut se déclarer par des signes cliniques soudains. En général, la brucellose débute par une phase aiguë avec des symptômes grippaux diffus tels que de la fièvre, des maux de têtes, des maux de dos, des malaises, de la myalgie et des douleurs généralisées (OIE, 2008).

Des sueurs abondantes peuvent apparaître surtout la nuit. Parfois on observe également une splénomégalie, une hépatomégalie, de la toux et une douleur dans la poitrine. Chez l'adulte, des signes gastro-intestinaux peuvent être aussi observés, comme de l'anorexie, de la nausée, des vomissements, de la diarrhée ou de la constipation.

Chez la plupart des patients, les symptômes disparaissent après 2 ou 4 semaines et sont suivis par une rémission spontanée. Chez d'autres, les symptômes disparaissent et réapparaissent de manière intermittente tous les 2 à 14 jours. C'est pour cette raison que la brucellose humaine est aussi appelée « fièvre ondulante ». Dans la forme ondulante de la maladie, les malades guérissent souvent spontanément dans les 3 à 12 mois.

Dans quelques cas, la maladie peut prendre une forme chronique. Lors de cette phase chronique, il y a un risque non négligeable de complications importantes et fatales. A ce stade de la maladie, l'infection peut atteindre beaucoup d'autres parties de l'organisme comme les méninges, les articulations ou le système génital. L'endocardite infectieuse est l'une des complications les plus sérieuses qui occasionne souvent la mort (Jacobs *et al.*, 1990) (Cohen *et al.*, 1997).

A cause de toutes ces caractéristiques, *Brucella* est considérée comme une arme bactériologique potentielle de bioterrorisme (Pappas *et al.*, 2006a) (CDC, 2009).

7.2.4. Les personnes à risque

Grâce aux mesures prises pour contrôler la brucellose, cette maladie a presque été éradiquée dans la plupart des pays industrialisés (Yagupsky and Baron, 2005) (Noviello *et al.*, 2004). Dans ces pays, la maladie se limite aux personnes qui ont voyagé dans des régions en voie de développement.

Actuellement, les personnes à risque dans les pays industrialisés sont les personnes ayant une profession qui les mettent directement en contact avec un animal infecté par *Brucella* (Guerra, 2007). C'est le cas par exemple des éleveurs, des agriculteurs, des vétérinaires ou du personnel des abattoirs.

Le personnel de laboratoire manipulant des *Brucella* est également particulièrement exposé aux risques, principalement lorsqu'il est en contact accidentellement avec la bactérie sous forme d'aérosol (Noviello *et al.*, 2004) (Robichaud *et al.*, 2004) (CDC, 2009).

7.2.5. Traitement

Le traitement préconisé par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) contre la brucellose aiguë chez l'adulte est un traitement antibiotique journalier de 600mg à 900mg de rifampicine conjugué avec 200mg de doxycycline pendant un minimum de 6 semaines (Corbel, 1997).

Bien que des vaccins existent pour traiter les animaux, à l'heure actuelle il n'y a aucun vaccin disponible pour l'homme (Schurig *et al.*, 2002). Cependant, l'OMS a défini qu'en plus d'un programme d'éradication et de contrôle de la brucellose animale, le développement d'un vaccin chez l'Homme était une priorité majeure (Godfroid *et al.*, 2005).

7.2.6. La brucellose humaine en Europe

La brucellose humaine est largement répandue à travers le monde et l'on recense plus de 500.000 nouveaux cas par an (Pappas *et al.*, 2006b). En Europe, la mise en place d'un système de surveillance et de contrôle de la maladie a permis de diminuer drastiquement le nombre de cas de brucellose humaine et de contrôler son évolution (Pappas *et al.*, 2006b).

A l'heure actuelle, les cas de brucellose humaine sont devenus très rares dans certains pays du nord de l'Europe comme la Belgique, cependant les pays du pourtour méditerranéen sont encore en proie à la maladie (Figure 32). En Belgique, les cas de brucellose humaine sont principalement dus à des cas importés (ISP, 2007).



Figure 32 : Incidence de la brucellose humaine en Europe. En vert : régions où la brucellose humaine est rare, en rouge : régions endémiques, en blanc : régions non endémiques (Pappas *et al.*, 2006b).

Malgré le contrôle de la maladie, il est important de garder la brucellose sous surveillance. En effet, la brucellose animale chez les animaux sauvages est présente et pourrait être une nouvelle source de contamination et de réémergence de la maladie chez les animaux d'élevage et donc aussi pour l'homme (Godfroid, 2002) (Maurin, 2005). Par exemple, la présence de sangliers ou de lièvres contaminés par *Brucella suis* biovar 2 en France pourrait être un vecteur de la réémergence de la brucellose porcine (Garin-Bastuji, 2000).

7.3. **Brucella : une adepte du « cocooning » intracellulaire**

L'augmentation du nombre de *Brucella* dans l'hôte est principalement due à sa capacité de se répliquer dans certaines cellules hôtes et d'éviter les mécanismes d'élimination comme les autres pathogènes intracellulaires (Ko and Splitter, 2003).

La survie et la multiplication de *Brucella* en macrophage est une étape importante responsable de la chronicité de la brucellose (Celli and Gorvel, 2004). Cela permet à *Brucella* d'échapper aux mécanismes extracellulaires de défense de l'hôte tels que les anticorps ou le complément (Ko and Splitter, 2003).

Pour se répliquer dans la cellule, *Brucella* emprunte un trafic intracellulaire la menant vers une vacuole répliquative possédant des marqueurs membranaires caractéristiques du reticulum endoplasmique rugueux (Gorvel, 2008) (Figure 33).

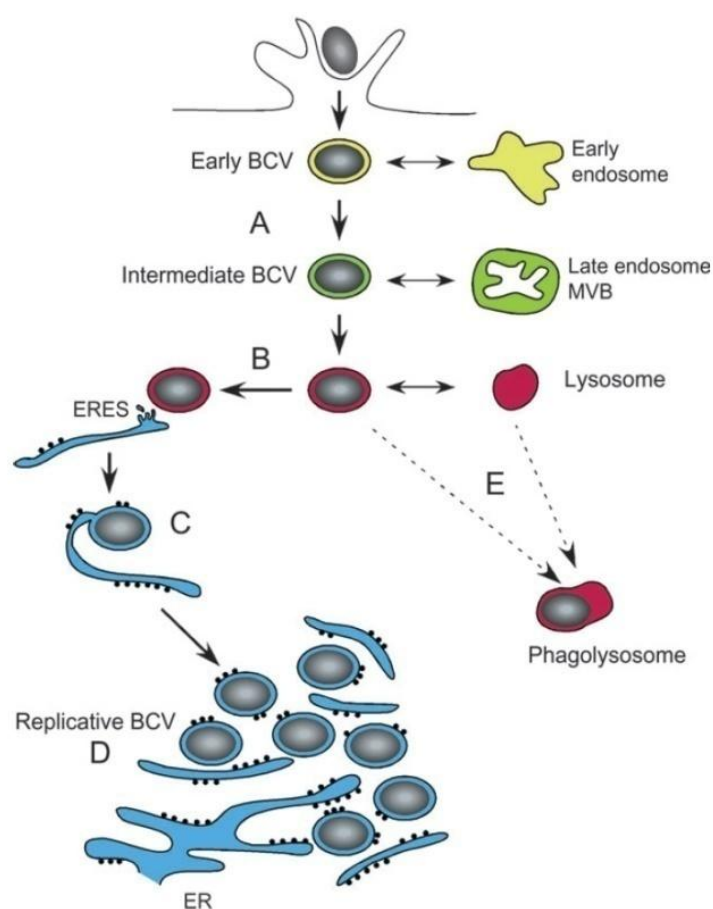


Figure 33 : Après son internalisation dans la cellule, *Brucella* voyage vers le réticulum endoplasmique (RE) dans une vacuole membranaire appelée BCV (*Brucella* *C*ontaining *V*acuole). (A) Au cours de ce parcours, la vacuole interagit séquentiellement avec les endosomes précoces (en jaune), puis les endosomes tardifs et les corps multi-vésiculaires (MVB) (en vert) avant de fusionner avec les lysosomes (en rouge). (B et C) Toutes ces interactions sont nécessaires pour que le BCV intermédiaire puisse se connecter à un site de liaison du RE (ERES) pour ensuite fusionner au RE (en bleu). (D) Le BCV intermédiaire évolue ensuite en BCV réplcatif dérivé du RE dans lequel *Brucella* va se répliquer. (E) Dans le cas d'un mutant du système de sécrétion de type IV VirB, la vacuole n'atteint pas le RE et évolue en une vacuole bactéricide appelée phagolysosome (Starr *et al.*, 2008).

L'entrée de *Brucella* dans la cellule est la première étape de la colonisation cellulaire. Des microdomaines membranaires riches en cholestérol appelé « *lipid raft* » sont nécessaires à cette étape (Watarai *et al.*, 2002) (Watarai, 2004). Cela suggère qu'un ou plusieurs récepteurs reconnaissant *Brucella* soient situés dans ces *lipid raft* (Celli, 2006).

Rapidement après son internalisation, *Brucella* forme une vacuole précoce nommée *Early BCV* (*Brucella*-*C*ontaining *V*acuole). Après une interaction avec les endosomes précoces, la vacuole s'acidifie et se transforme en vacuole intermédiaire. Cette acidification de la vacuole est nécessaire pour la survie de *Brucella* (Porte *et al.*, 1999). La vacuole

intermédiaire entre ensuite en interaction avec les endosomes tardifs et les corps multivésiculaires (Figure 33A).

Afin d'atteindre le réticulum endoplasmique pour se répliquer, la vacuole entre en contact avec une partie de la membrane du réticulum endoplasmique appelé ERES (Endoplasmic Reticulum Exit Site) (Celli *et al.*, 2005). Ce mécanisme fait intervenir la petite GTPase Sar1 (Celli *et al.*, 2005) (Roy, 2005).

Ensuite, la vacuole se transforme en une vacuole répliquative dans laquelle *Brucella* se réplique. Ce compartiment est spécifique de *Brucella* et ne correspond à aucun organe cellulaire, pour cette raison il a aussi été baptisé *Brucellosome* (Kohler *et al.*, 2003) (Kohler *et al.*, 2002a). La vacuole de départ subit donc une série de changements avant de devenir la niche répliquative (Figure 33D).

Il était communément admis que la vacuole intermédiaire évite la fusion avec le lysosome (Celli, 2006) (Gorvel, 2008). Cependant, il a récemment été proposé que la vacuole intermédiaire fusionne bel et bien avec le lysosome et que cette fusion soit nécessaire pour la maturation en vacuole répliquative (Starr *et al.*, 2008).

Le système de sécrétion de type IV VirB est aussi nécessaire au bon déroulement du trafic intracellulaire de *Brucella* (Delrue *et al.*, 2001). Par exemple, il intervient dans la biogenèse de la vacuole répliquative dérivée du réticulum endoplasmique dans laquelle *Brucella* se réplique (Delrue *et al.*, 2001) (Comerci *et al.*, 2001).

Un mutant *virB* n'est pas capable d'atteindre la niche de réplication et la vacuole évolue en un phagolysosome fatal pour la survie de *Brucella* (Figure 33E) (Celli *et al.*, 2003). Il est probable que la fusion des lysosomes avec la vacuole soit un signal intravacuolaire nécessaire à la fonction du système VirB (Starr *et al.*, 2008).

Le système de sécrétion de type IV VirB pourrait sécréter des effecteurs qui limiteraient la fusion des lysosomes avec la vacuole et permettrait à *Brucella* de survivre (Starr *et al.*, 2008). Le glucane cyclique β -1,2 (C β G) synthétisé par *Brucella* intervient également dans le contrôle de la fusion de la vacuole avec des lysosomes (Arellano-Reynoso *et al.*, 2005).

7.4. Brucella et son système flagellaire

7.4.1. Mise en évidence des gènes encodant une structure flagellaire

Bien que *Brucella* fut longtemps considérée comme non flagellée et non mobile, trois gènes flagellaires furent découverts chez *B. abortus* (Halling, 1998) (Letesson *et al.*, 2002). Depuis lors, le séquençage de 8 génomes de *Brucella* a permis de montrer que *Brucella* possède les gènes flagellaires nécessaires pour assembler un flagelle fonctionnel. Les gènes présents sont visibles sur le site KEGG (Figure 34) (Kanehisa *et al.*, 2004).

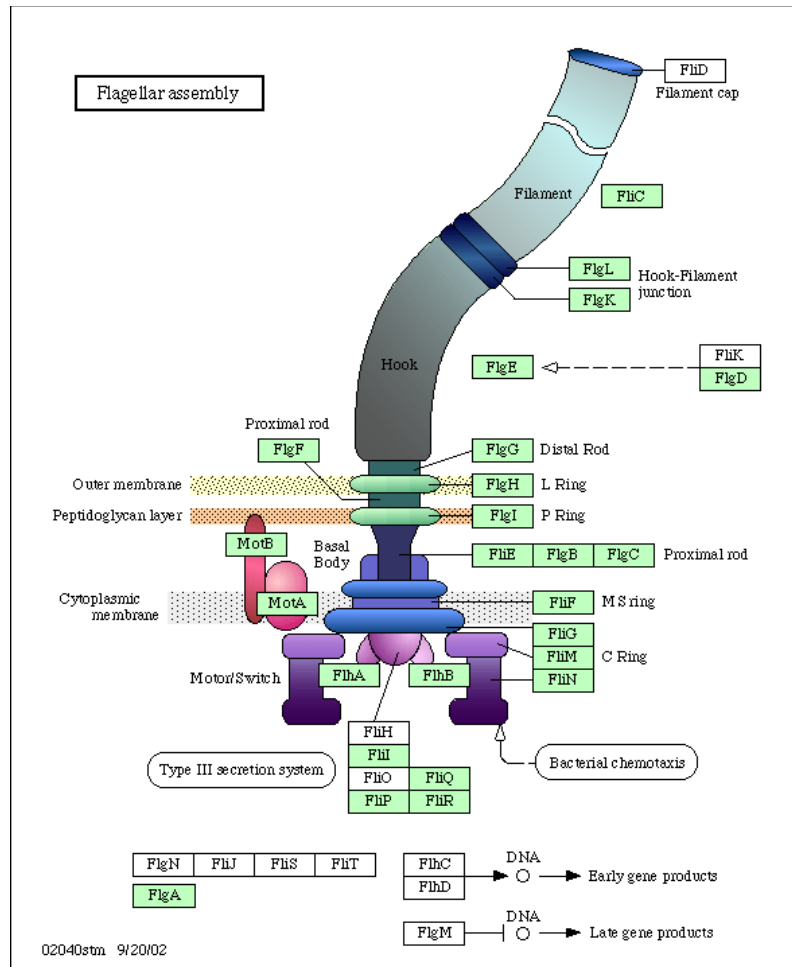


Figure 34 : Représentation schématique de la structure flagellaire avec les gènes flagellaires présents chez *Brucella* selon le site KEGG PATHWAY (KEGG, 2009). Les gènes présents sont en vert et les gènes absents en blanc. Notons que le gène *fliK* est sans doute présent par homologie avec *S. meliloti* (Eggenhofer *et al.*, 2006).

Depuis lors, 37 gènes flagellaires sont répertoriés en 3 loci sur le petit chromosome de *Brucella* (Fretin *et al.*, 2005). Bien que les gènes de structure ou de la régulation d'un flagelle soient présents, il n'y a aucun gène codant pour un système de chimiotactisme (DelVecchio *et al.*, 2002b) (DelVecchio *et al.*, 2002a) (Fretin *et al.*, 2005).

7.4.2. Mise en évidence d'une activité des gènes flagellaires *in vitro* et *in vivo*

Malgré la première découverte de ces gènes en 1998, aucune structure extracellulaire, ni aucune protéine flagellaire n'avait jamais été détectée auparavant. C'est pour cette raison que *Brucella* fut toujours considérée comme non mobile et non flagellée.

Néanmoins, la création d'une banque de mutants de *Brucella melitensis* a mis en évidence que le gène flagellaire *fliF* est nécessaire à l'infection en modèle murin (Lestrade *et al.*, 2003). Il était donc probable que l'expression du flagelle soit un événement transitoire chez *Brucella*, ce qui pourrait expliquer qu'il fut si longtemps ignoré.

Afin de résoudre cette énigme, l'expression du gène *fliF* a été testée tout au long d'une croissance en milieu liquide de *B. melitensis* (Fretin *et al.*, 2005). Le promoteur de *fliF* a été fusionné au gène *lacZ* et son activité a été suivie par dosage de la β -galactosidase.

Cette expérience a montré que le gène *fliF* était actif uniquement au début de la phase exponentielle de croissance à une DO_{600} située entre 0.2 et 0.3. La création d'anticorps polyclonaux reconnaissant FlgE et FliC a permis de montrer par après que les protéines FlgE (le coude) et FliC (le filament) étaient également produites à ce moment-là (Figure 35) (Fretin *et al.*, 2005) (Delrue *et al.*, 2005) (Delory *et al.*, 2006) (Leonard *et al.*, 2007).

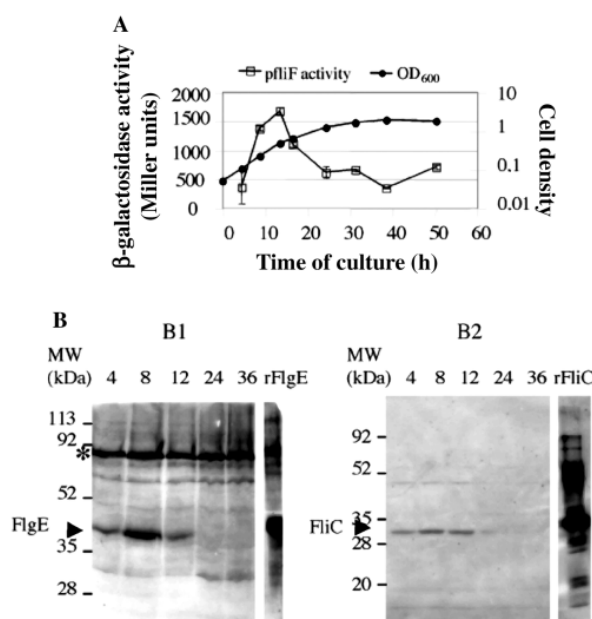


Figure 35 : Expression et production transitoire des gènes et des protéines flagellaires chez *Brucella melitensis*. En A, Le promoteur du gène *fliF* a une activité maximale après environ 10h de croissance en milieu liquide riche (ligne avec carrés). L'activité est mesurée par dosage de la β -galactosidase (à gauche). En B, les protéines FlgE (B1) et FliC (B2) sont produites également après environ 8-10h de croissance (Fretin *et al.*, 2005).

Des mutants des gènes flagellaires situés dans les 3 loci flagellaires ont ensuite été construits par intégration d'un plasmide dans les gènes cible (les gènes *fliF*, *flhA*, *motB*, *flgE* et *fliC*). Après 4 semaines d'infection en souris, tous les mutants intégratifs flagellaires présentent une atténuation par rapport à une souche sauvage (Fretin *et al.*, 2005). Cela confirme que les gènes flagellaires interviennent dans la virulence de *B. melitensis*.

La création d'une banque de mutants par la technique de Signature-Tagged Mutagenesis (STM) en chèvre a également montré que le gène *flgF* était impliqué dans la virulence (Zygmunt *et al.*, 2006).

Il est probable que les gènes flagellaires interviennent lors de l'infection en cellule. En effet, le promoteur de *fliF* fusionné au gène *gfp* (Green Fluorescent Protein) montre une activité de celui-ci lors d'une infection en cellule (Fretin *et al.*, 2005). Néanmoins, aucune atténuation des mutants intégratifs flagellaires par rapport à une souche sauvage de *Brucella*

n'a encore pu être démontrée dans les modèles cellulaires testés jusqu'à présent (Nijskens, 2007).

7.4.3. Mise en évidence d'une régulation du système flagellaire

Depuis la découverte de ce système flagellaire, plusieurs régulateurs flagellaires ont été caractérisés. Parmi ceux-ci, on distingue FtcR (Flagellar two-component Regulator), VjbR (Vacuolar hijacking Brucella Regulator) et BlxR (Brucella LuxR-like Regulator).

7.4.3.1. Le régulateur VjbR

Le gène *vjbR* (BMEI1116) se trouve juste à côté des gènes flagellaires du 3^{ème} locus. VjbR est une protéine de 230 acides aminés homologue aux régulateurs de la famille LuxR (Delrue *et al.*, 2005).

Les régulateurs de cette famille de protéines contrôlent l'expression des gènes après une liaison aux petites molécules nommées N-acylhomosérine lactones (AHL) (Nasser and Reverchon, 2007). Les résidus responsables de la liaison aux AHL et le site de liaison à l'ADN retrouvé chez les régulateurs de la famille LuxR sont conservés pour VjbR (Delrue *et al.*, 2005).

VjbR est impliqué dans l'activation des gènes flagellaires (Delrue *et al.*, 2005) (Leonard *et al.*, 2007). En effet, la mutation de *vjbR* inhibe l'activité du promoteur de *fliF* et la production de FlgE et FlhC. Son activité semble commandée par les AHL puisque l'ajout d'AHL synthétiques dans une culture d'une souche sauvage de *B. melitensis* inhibe également l'activité du promoteur de *fliF* et la production de FlgE (Delrue *et al.*, 2005).

Notons que VjbR active le système de sécrétion de type IV VirB en se fixant directement sur le promoteur de l'opéron *virB* (Bonnot, 2007) (de Jong *et al.*, 2008). L'analyse de ce site de reconnaissance a permis de mettre évidence d'autres cibles de VjbR. Cela a aussi permis de mettre en évidence au moins 2 protéines sécrétées par le système de sécrétion de type IV chez *Brucella* : VceA et VceC (de Jong *et al.*, 2008). La présence d'un site de reconnaissance dans le promoteur de *fliC* laisse entrevoir la possibilité que la flagelline soit sécrétée par le système de sécrétion de type IV chez *Brucella*.

7.4.3.2. Le régulateur BlxR

Le gène *blxR* (BMEI1758) est aussi un homologue de la famille LuxR (Rambow-Larsen *et al.*, 2008). BlxR possède 25% d'identité et 45% de similarité avec VjbR. Tout comme VjbR, il possède également un domaine de liaison aux AHL et un domaine de liaison à l'ADN. La mutation de *blxR* réprime l'activité de plusieurs gènes flagellaires, comme par exemple *flhB* ou *flgJ*. Ce phénotype est similaire à celui observé pour le mutant *vjbR*.

Les deux régulateurs VjbR et BlxR activent leur propre expression mais semblent également s'activer mutuellement (Rambow-Larsen *et al.*, 2008). Ces 2 régulateurs LuxR activent également le système de sécrétion de type IV VirB. L'action de VjbR ou de BlxR est donc identique sur les gènes flagellaires mais aussi sur le système de sécrétion de type IV.

7.4.3.3. Le régulateur FtcR

FtcR est un homologue des régulateurs appartenant au système de régulation à deux composantes et contrôle l'expression des gènes flagellaires de *Brucella* (Leonard *et al.*, 2007). Le gène *ftcR* (BMEII0158) est situé au milieu du premier locus flagellaire, entre un gène codant une protéine hypothétique et le gène *flgE*.

La séquence polypeptidique de FtcR est bien conservée chez les membres des α -protéobactéries (Leonard *et al.*, 2007) (Rotter *et al.*, 2006). Notons que chez FtcR, de manière atypique, le résidu aspartate nécessaire à la phosphorylation des régulateurs à deux composantes est remplacé par un glutamate (Leonard *et al.*, 2007). Aucune protéine kinase potentielle qui phosphorylerait FtcR n'a pu être détectée chez *B.melitensis*.

FtcR est classé comme le régulateur principal de l'activation des gènes flagellaires de *Brucella* (Leonard *et al.*, 2007). Il s'agirait donc d'un régulateur de classe I au sommet de la hiérarchie des gènes flagellaires. Son homologue (nommé « Rem ») chez *Sinorhizobium meliloti* est également décrit comme le régulateur maître de classe I (Rotter *et al.*, 2006).

La mutation de *ftcR* annihile complètement la production des gènes flagellaires. Cette répression s'effectue en se liant directement aux promoteurs des gènes flagellaires (Leonard *et al.*, 2007) (Rotter *et al.*, 2006).

7.4.3.4. Schéma de régulation flagellaire chez *Brucella*

Nous avons dessiné un premier schéma de régulation flagellaire chez *Brucella* sur base de ces données (Figure 36). La hiérarchie des gènes flagellaires de *Brucella* est actuellement présentée en deux classes de gènes. Dans ce schéma, l'expression des gènes flagellaires est contrôlée par les régulateurs de classe I, VjbR, BlxR et FtcR. Néanmoins, nous considérons FtcR comme le régulateur maître principal (Leonard *et al.*, 2007).

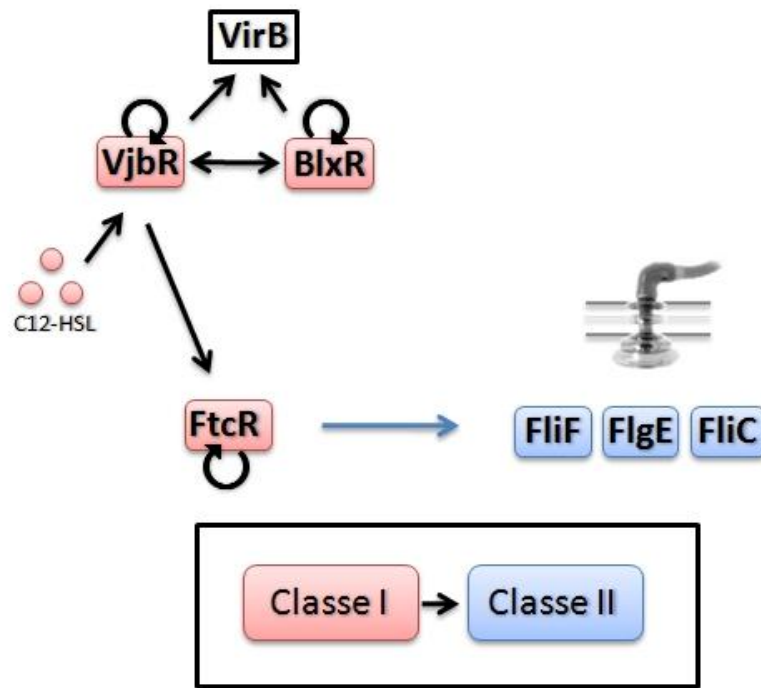


Figure 36 : Schéma de régulation des gènes flagellaires. Les gènes de classe I encodant des régulateurs du flagelle et sont représentés en rouge, les gènes de classe II encodant la structure du flagelle sont représentés en bleu. Les gènes *vjbR*, *blxR* et *ftcR* sont auto-controlés. Les flèches indiquent la cible de la régulation.

FtcR active ensuite la transcription des gènes flagellaires (*fliF*) et la production des protéines flagellaires (FlgE et FliC). Nous tenterons de mieux comprendre la régulation du système flagellaire de *Brucella* et de développer ce schéma (Voir la partie Conclusion).

PARTIE II

OBJECTIFS

II OBJECTIFS

Bien que *Brucella* fut longtemps considérée comme non flagellée, les découvertes de ces dernières années ont montré qu'elle possède tous les gènes pour produire un flagelle et que ceux-ci sont exprimés. Les protéines flagellaires FlgE et FliC sont également produites de manière transitoire lors de la croissance de *B. melitensis* en milieu de culture riche. Cependant, peu de choses sont connues sur la régulation des gènes encodant la structure flagellaire chez cette bactérie et aucun flagelle n'a encore pu être visualisé, laissant planer un doute sur l'existence réelle d'un flagelle chez *Brucella*.

Le premier objectif est tout d'abord de vérifier l'existence d'une structure flagellaire chez *Brucella*. Pour se faire, nous observerons des *B. melitensis* en microscopie optique et électronique au moment de l'expression des gènes flagellaires, c'est-à-dire en début de phase exponentielle.

Deuxièmement, nous allons construire des mutants flagellaires en utilisant une technique de mutation qui évite les effets polaires. La disposition de ces mutants nous permettra d'étudier la régulation de l'assemblage du flagelle par la suite. Nous muterons les gènes de structure flagellaire *fliF* (encodant l'anneau MS du corps basal), *flgE* (encodant le coude) et *fliC* (encodant la flagelline). Nous étudierons également la régulation de la flagelline en mutant le gène *flbT* encodant un régulateur hypothétique de la flagelline. En effet, par homologie avec *C. crescentus*, FlbT pourrait être un point de contrôle sur l'assemblage du flagelle chez *Brucella*. Par la suite, nous caractériserons le phénotype de ces mutants lors d'infection murine et par détection de la flagelline et de la protéine FlgE comparé à une souche sauvage de *B. melitensis*. Nous développerons également les données de surexpression des gènes flagellaires dans un mutant du facteur sigma RpoE1.

Pour terminer, nous tenterons de dessiner un schéma de régulation flagellaire. Sur base des données recueillies lors de recherches bibliographiques, nous rechercherons des régulateurs potentiels du flagelle chez *Brucella*. Nous effectuerons ensuite une analyse *in silico* du génome de *Brucella* à l'aide du programme RSAT. En utilisant des consensus de fixation à l'ADN de régulateurs flagellaires décrits, nous rechercherons la présence de ces consensus dans les promoteurs flagellaires. Ces données et les données expérimentales récoltées lors de ce travail nous permettront de dessiner une ébauche plus détaillée de la régulation du système flagellaire de *Brucella*.

PARTIE III

RESULTATS

III RESULTATS

Bien que *Brucella* fût décrite depuis plus de 100 ans comme non flagellée et non mobile, les données obtenues ces dernières années prouvent que les gènes flagellaires sont nécessaires à sa survie lors de l'infection (voir point 6.4 de l'introduction) (Lestrade *et al.*, 2003) (Fretin *et al.*, 2005) (Zygmunt *et al.*, 2006).

A partir des données obtenues sur le flagelle de *Brucella*, nous avons tenté de visualiser pour la première fois le flagelle au moment de son expression.

1. Visualisation d'un flagelle en microscopie optique

Nous avons commencé par tester la technique décrite par Kodaka, une technique simple et rapide qui permet de détecter la présence d'un flagelle par microscopie optique (Kodaka *et al.*, 1982).

Un échantillon de la souche sauvage de *Brucella melitensis* a été prélevé en début de phase exponentielle (DO_{600} d'environ 0.2), coloré par la coloration « Ryu » décrite par Kodaka (Kodaka *et al.*, 1982), puis visualisé en microscopie optique. Nous avons utilisé une souche de *Caulobacter crescentus* comme contrôle positif car cette population est très flagellée et le flagelle facilement observable (Figure 37).

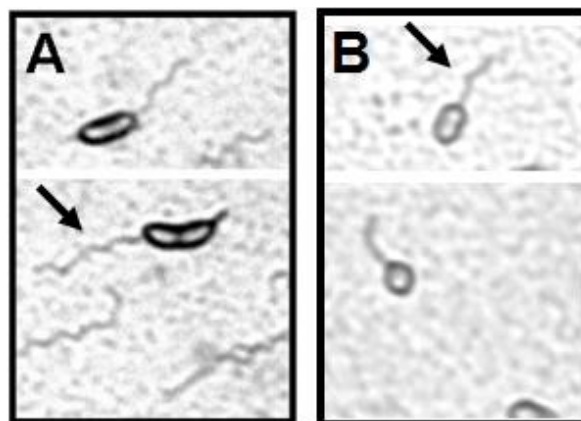


Figure 37 : Visualisation des flagelles en microscopie optique de *Caulobacter crescentus* (A) et de *Brucella melitensis* (B) après une coloration « Ryu » sur des échantillons prélevés en début de phase exponentielle. Les flagelles sont annotés d'une flèche noire.

La coloration sur la Figure 37A permet de visualiser l'aspect typique des *C. crescentus* en prédivison, c'est-à-dire une bactérie flagellée, et une bactérie munie d'un « stalk ». De nombreuses *Caulobacter* flagellées ainsi que des flagelles isolés sont également observables (Figure 37A).

En analysant l'échantillon de *Brucella* nous avons pu détecter la présence de bactéries munies d'un appendice filamenteux ressemblant à un flagelle de type polaire (Figure 37B). Bien que cette méthode permette de détecter rapidement et facilement la présence d'un

flagelle, elle ne permet pas d'analyser la structure du filament en détail. A cette fin, nous avons eu recours à la microscopie électronique.

2. Visualisation d'un flagelle en microscopie électronique à transmission (TEM)

Afin de confirmer la présence d'un flagelle chez *B. melitensis*, nous avons analysé un échantillon prélevé dans les mêmes conditions en microscopie électronique à transmission à l'aide d'une coloration négative à l'acétate d'uranyle 2% (Figure 38).

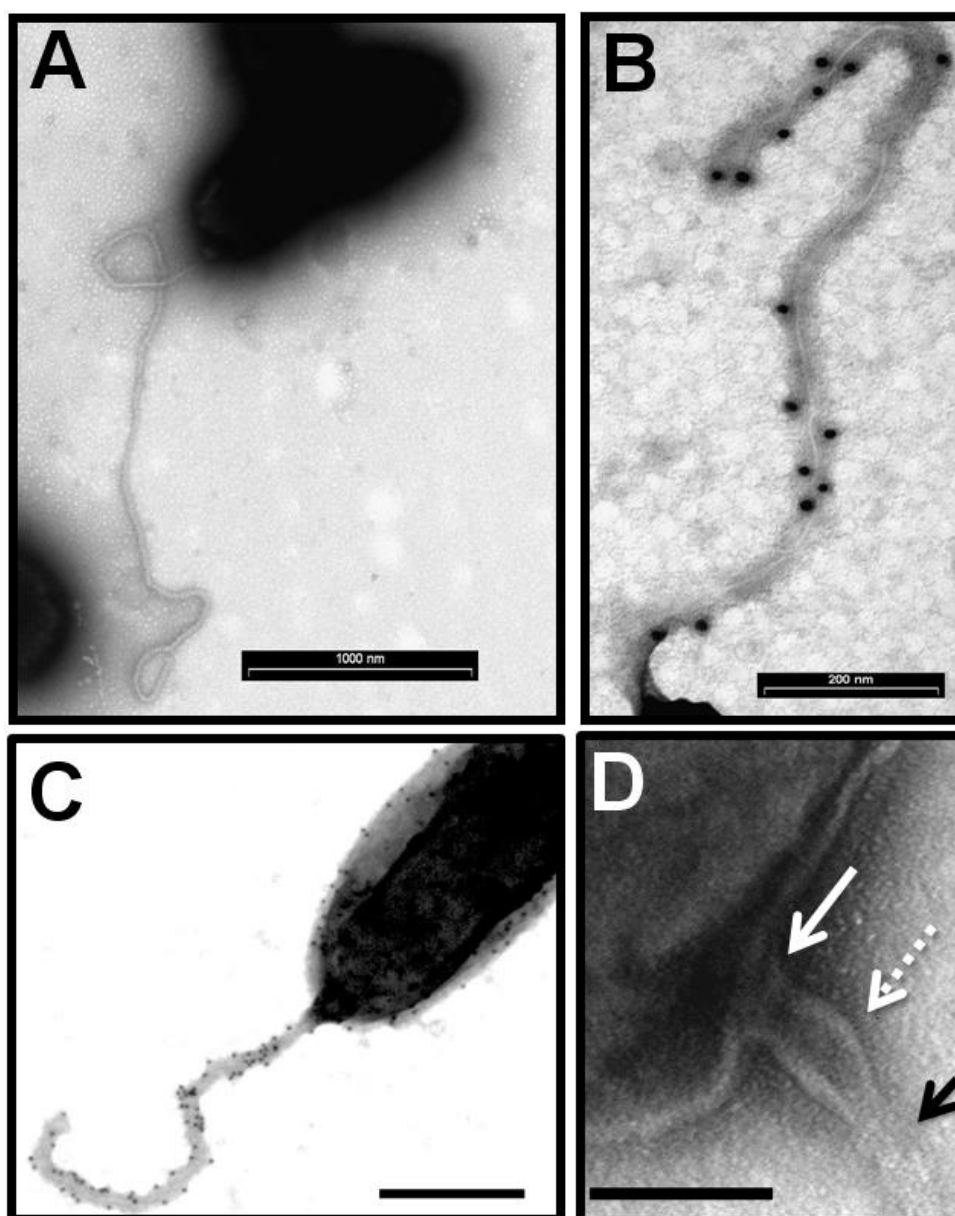


Figure 38 : Visualisation du flagelle de *Brucella melitensis* en microscopie électronique à transmission (A), et marquage de la gaine du filament avec des anticorps monoclonaux reconnaissant le LPS de *Brucella melitensis* et des anticorps secondaires couplés à des billes d'or d'environ 20 nm de diamètre (B et C). (D) Gros plan de la base du flagelle, la flèche noire montre le filament, la flèche blanche pointillée le coude et la flèche blanche pleine l'emplacement du corps basal. Les échantillons sont colorés à l'acétate d'uranyle 2%. La barre noire représente 1 μ m (A), 200 nm (B) 500 nm (C) et 100 nm (D).

Sur les images obtenues, nous observons la présence de bactéries munies d'un flagelle polaire de plusieurs μ m de long (Figure 38). Ce flagelle présente néanmoins quelques particularités.

Le diamètre d'un flagelle bactérien est généralement situé entre 10 et 15 nm, or, le flagelle de *B. melitensis* est épais de plus de 30 nm. Chez certaines bactéries, le filament de

flagelline est recouvert d'une gaine de fonction inconnue contenant des protéines et du LPS (Fuerst and Perry, 1988).

Pour vérifier si le filament de *Brucella* est bien entouré d'une gaine, nous avons utilisé des anticorps monoclonaux reconnaissant le LPS de *Brucella*. Ensuite, nous avons utilisé des anticorps secondaires couplés à des billes d'or d'environ 20 nm de diamètre. Ces billes d'or sont denses aux électrons et apparaissent comme des points noirs. De cette façon, nous pouvons marquer indirectement le LPS et visualiser sa présence en microscopie électronique. Après le marquage, nous observons les billes d'or autour de la bactérie (Figure 38C), mais également autour du filament (Figure 38B et C), ce qui confirme que le flagelle polaire de *B. melitensis* est recouvert d'une gaine contenant du LPS.

Les flagelles de type gainé présentent souvent une structure distale en forme de club de golf. C'est ce qui est décrit par exemple chez *Helicobacter pylori* ou *Vibrio fischeri* (Sato and Homma, 2000) (Allen and Baumann, 1971). Nous retrouvons également parfois cette structure distale en vésicule au bout du flagelle de *B. melitensis* (Figure 39).

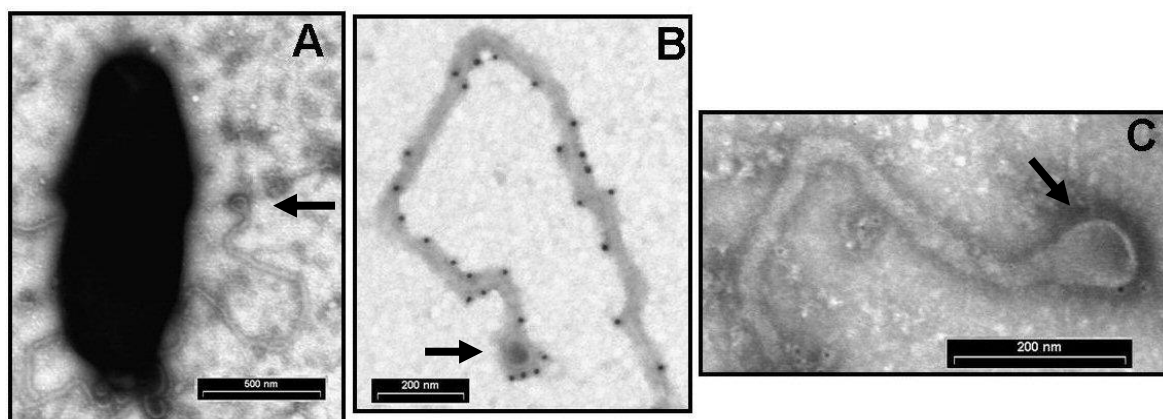


Figure 39 : Visualisation de la structure distale du filament de *Brucella melitensis* en microscopie électronique à transmission (A), après un marquage avec des anticorps monoclonaux reconnaissant le LPS de *Brucella melitensis* et des anticorps secondaires couplés à des billes d'or d'environ 15 nm de diamètre (B), et un gros plan sur la structure distale du filament (C). Les échantillons sont colorés avec de l'acétate d'uranyle 2%. Flèche : extrémité distale du flagelle. Les barres noires représentent 500 nm (A) et 200 nm (B et C).

Dans la partie proximale du flagelle, nous observons souvent une structure en boucle (Figure 40). Lors du début de sa biogenèse, il est possible que le flagelle se structure de cette façon à cause de l'agencement hélicoïdal de la flagelline en filament.

Notons que sur la Figure 40A2, nous observons clairement le filament (flèche noire) entouré par la gaine (flèche blanche) comme, par exemple, un fil électrique isolé par une gaine en caoutchouc.

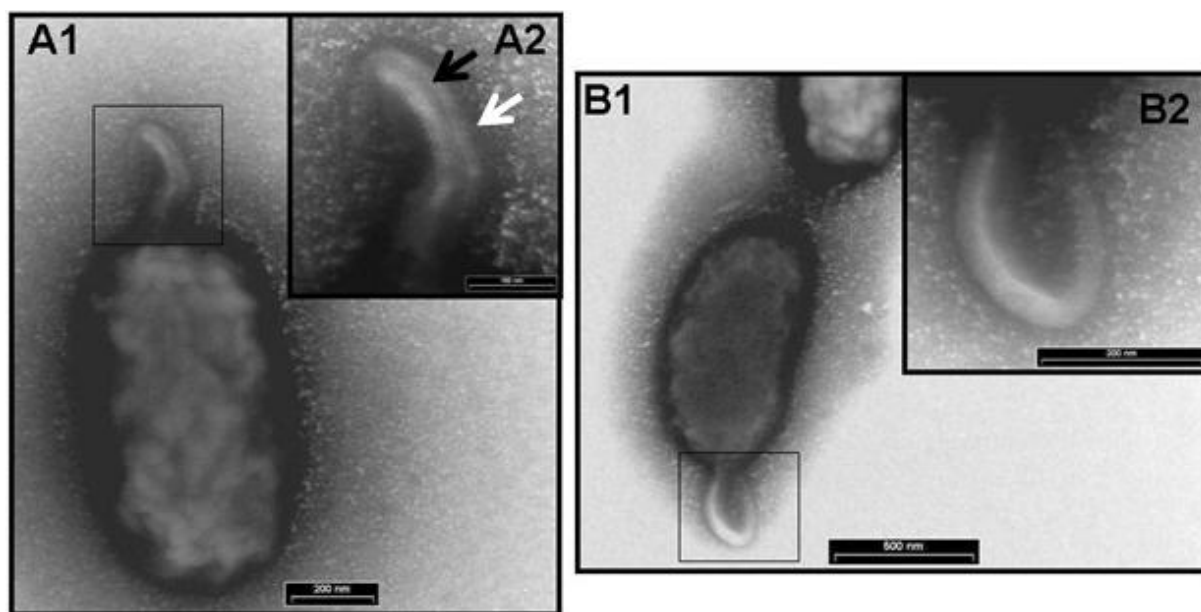


Figure 40 : Visualisation de la structure proximale du flagelle de *Brucella melitensis* en microscopie électronique à transmission (A1, B1). Gros plan de la structure proximale (A2, B2). (A2) Flèche noire, filament; flèche blanche, gaine entourant le flagelle. Les barres noires représentent 100 nm (A2), 200 nm (A1, B2) et 500 nm (B1).

3. Construction des mutants flagellaires

Récemment, nous avons montré que les gènes flagellaires de *B. melitensis* situés dans les 3 loci flagellaires du petit chromosome II sont nécessaires pour l'infection *in vivo* lors d'une infection murine (Lestrade *et al.*, 2003) (Fretin *et al.*, 2005) (Leonard *et al.*, 2007).

Cependant, les gènes de structure flagellaires ont été mutés par insertion d'un plasmide qui disruptait le gène visé. Les gènes flagellaires étant organisés en opéron, et pour éviter la possibilité d'avoir un effet polaire sur certains gènes avec ce type de mutants intégratifs, nous avons construit de nouveaux mutants flagellaires par remplacement allélique, en utilisant une mutagenèse dépourvue d'effet polaire (Figure 41) (Menard *et al.*, 1993) (Dozot *et al.*, 2006).

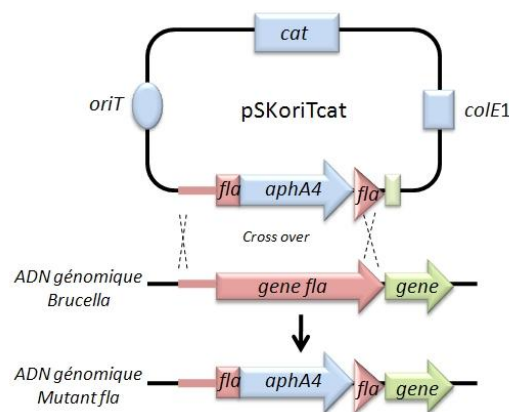


Figure 41 : Schéma du système de mutagenèse utilisant la cassette de résistance à la kanamycine *aphA4* (Voir la partie Matériel et méthodes) (Menard *et al.*, 1993) (Dozot *et al.*, 2006).

A l'aide de cette méthode, les gènes *fliF*, *flgE*, *fliC* et *flbT* (codant respectivement l'anneau MS, le coude, le filament, et un régulateur potentiel de la flagelline) ont été mutés (voir Figure 42). Les mutants ont été sélectionnés sur un milieu de culture solide contenant de la kanamycine, puis ont été testés et validés par PCR.

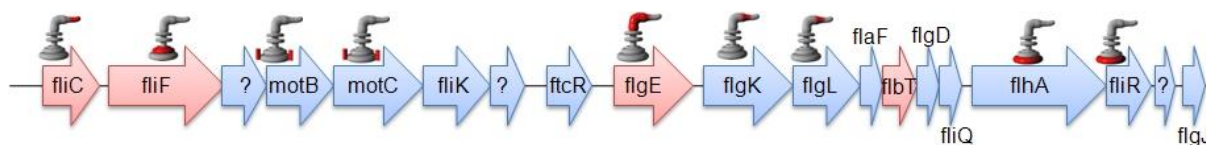


Figure 42 : Organisation des gènes flagellaires de *Brucella* situés sur le premier locus flagellaire du chromosome II. La partie rouge du flagelle miniature au-dessus des gènes représente la localisation de la protéine codée par le gène. En rouge, les gènes mutés lors de cette thèse.

Une fois les mutants obtenus, des souris *balbC* ont été infectées par groupes de 7 par voie intrapéritonéale et sacrifiées après 5 jours et 4 semaines d'infection. Les bactéries ont ensuite été récupérées de la rate et étalées à différentes dilutions sur des boîtes de cultures. Les colonies résultantes ont été dénombrées (Figure 43).

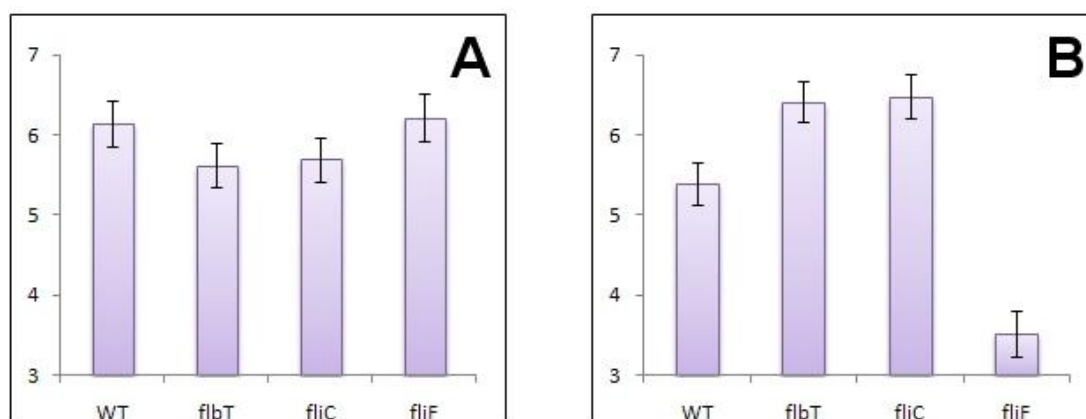


Figure 43 : Résultat de l'infection par voie intrapéritonéale des souris *balbC* avec la souche sauvage *B. melitensis* (WT), le mutant *flbT* (flbT), le mutant *fliC* (fliC) et le mutant *fliF* (fliF) après 5 jours (A) et 4 semaines (B) d'infection. Les graphes sont exprimés en logarithme du nombre CFU par rate (en ordonnée).

Après 5 jours d'infection, aucune différence significative n'est observable entre les mutants flagellaires et la souche sauvage (Figure 43A). Les études préalables d'infection de souris avec des mutants flagellaires de *B. melitensis* montrent néanmoins qu'un effet d'atténuation est observable à partir de 4 semaines (Fretin *et al.*, 2005).

Après 4 semaines d'infection, nous observons deux phénotypes différents (Figure 43B). Le mutant *fliF* est atténué de plus de 2 log par rapport à la souche sauvage, par contre, les mutants *fliC* et *flbT* sont quant à eux plus virulents d'environ un log.

Le phénotype du nouveau mutant *fliF* est identique à celui décrit par Fretin *et al.* (Fretin *et al.*, 2005). Par contre, les résultats de virulence exacerbée du nouveau mutant *fliC* sont opposés à l'atténuation observée pour le mutant *fliC* intégratif (Fretin *et al.*, 2005). Il se peut que le phénotype d'atténuation obtenu auparavant avec le mutant *fliC* soit dû à un effet polaire sur le gène *fliF* situé juste en aval du gène *fliC* (Voir Figure 42).

Le phénotype de virulence exacerbée du mutant *flbT* est comparable au phénotype du nouveau mutant *fliC*. Or, FlbT est un régulateur de la flagelline chez *C. crescentus*, il se pourrait donc que FlbT soit un activateur de la flagelline chez *B. melitensis*.

4. Etude de la production de la flagelline

Pour étudier le rôle de FlbT sur la flagelline de *Brucella*, nous avons analysé la production de la flagelline par Western Blot.

Dans les modèles de hiérarchie des gènes flagellaires, la flagelline fait partie de la dernière classe de gènes, c'est-à-dire que son gène n'est transcrit que si les gènes situés en amont de cette hiérarchie sont exprimés. Une mutation des gènes situés dans les classes en amont de la classe de la flagelline inhibe la production de la flagelline.

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons analysé la production de flagelline par Western Blot dans des souches de *B. melitensis* mutées dans des gènes appartenant aux différentes classes potentielles.

Nous avons utilisé le mutant *ftcR* codant pour le régulateur maître flagellaire FtcR (Leonard *et al.*, 2007) comme contrôle négatif. Celui-ci fait partie de la classe I potentielle, il est l'interrupteur flagellaire. Comme cela fut décrit chez *B. melitensis* et chez *S. meliloti*, la mutation de *ftcR* inhibe la production de flagelline (Leonard *et al.*, 2007), (Rotter *et al.*, 2006).

Afin d'élucider les résultats d'infection en souris, nous avons testé les mutants *fliC* et *flbT*. En prenant *C. crescentus* comme modèle le plus proche de *Brucella* au niveau de la hiérarchie flagellaire, nous avons choisi *fliF* comme gène de classe II et construit un mutant *flgE* comme gène potentiel de classe III. Les échantillons ont été prélevés à une DO₆₀₀ entre 0.15 et 0.3, c'est-à-dire au moment où le flagelle est produit (Figure 44).

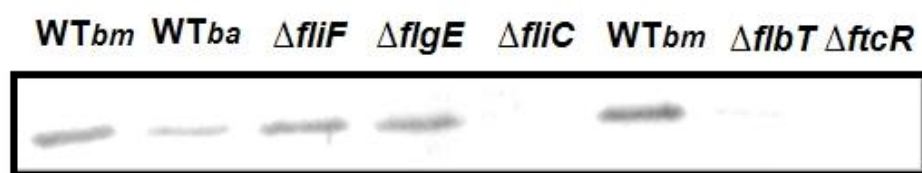


Figure 44 : Analyse de la production de la protéine FliC (flagelline) de *Brucella* par Western Blot après 8h de croissance en milieu liquide. Dans une souche sauvage de *B. melitensis* (WTbm), dans une souche sauvage de *B. abortus* (WTba), dans le mutant *fliF*, dans le mutant *flgE*, dans le mutant *fliC*, dans le mutant *flbT* et dans un mutant *ftcR*.

Comme dans la souche sauvage (Figure 44 WTbm), nous observons que la flagelline de *Brucella* est toujours produite en l'absence du gène *fliF* ou *flgE*.

Chez les autres bactéries, la flagelline est produite uniquement lorsque le corps basal et le coude sont assemblés. Nous constatons que chez *B. melitensis*, la production de la flagelline n'est pas dépendante de la présence de la structure flagellaire. Par contre, comme dans le contrôle négatif $\Delta fliC$, la flagelline n'est pas produite dans le mutant *flbT* et *ftcR*. Nous constatons donc que la production de flagelline est dépendante des régulateurs FlbT et FtcR.

Notons que jusqu'à présent, le flagelle n'a été étudié que dans l'espèce *B. melitensis*. Pour savoir si la flagelline est produite dans le reste du genre *Brucella*, nous avons également testé un échantillon de la souche sauvage de *Brucella abortus* (WTba).

Nous observons aussi une production de flagelline chez *B. abortus*, ce qui montre pour la première fois que la production de flagelline n'est pas restreinte à l'espèce *B. melitensis* mais est aussi répandue chez d'autres espèces de *Brucella*.

5. Visualisation des mutants flagellaires en microscopie électronique à transmission

Pour déterminer si la production de flagelline est liée à la présence d'un filament, les mutants ont été analysés en microscopie électronique comme décrit au point 2.

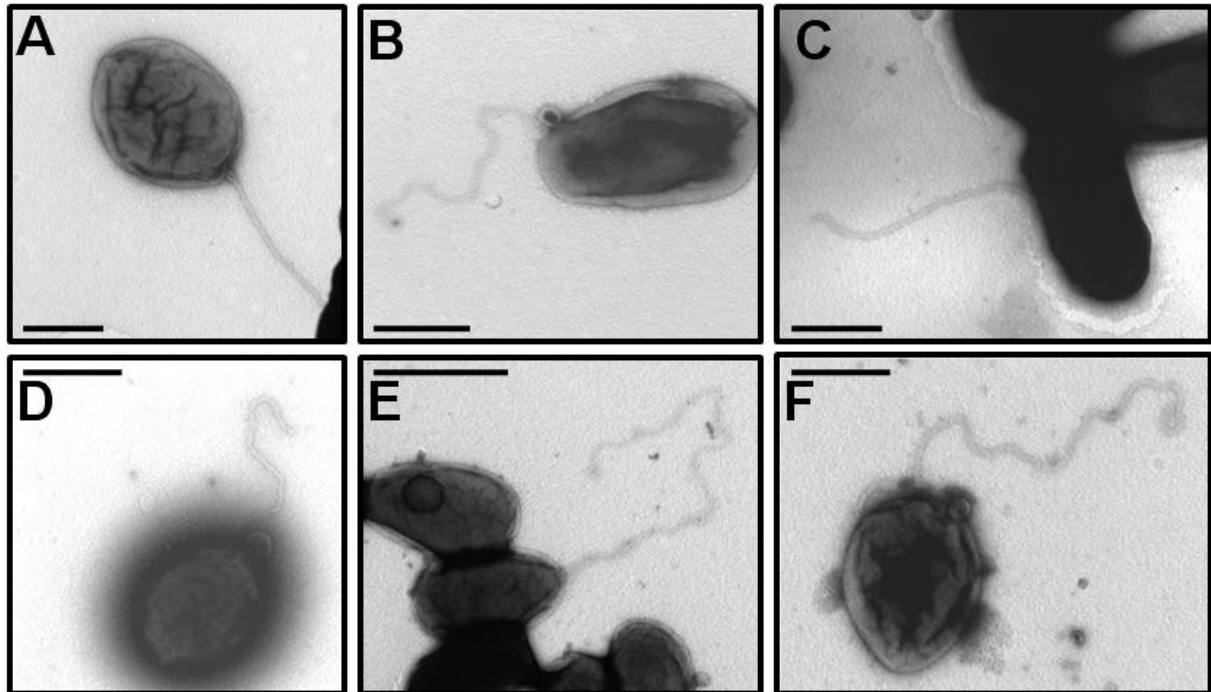


Figure 45 : Photos de *B. melitensis* sauvage (A), du mutant *ftcR* (B), du mutant *virB* (C), du mutant *fliF* (D), du mutant *flgE* (E), et du mutant *fliC* (F) en microscopie électronique à transmission. Les échantillons sont colorés à l'acétate d'uranyle 1%. Les barres noires représentent 1 μ m pour la photo E et 500 nm pour les autres photos.

Que les mutants flagellaires produisent (*fliF*, *flgE*) ou non (*ftcR*, *fliC* et *flbT*) de la flagelline (voir Figure 44) une structure filamenteuse est toujours présente (Figure 45).

Ces résultats peuvent s'expliquer par la présence d'une gaine autour du filament. Par exemple, un mutant *fliC* de *Bdellovibrio bacteriovorus* produit toujours une structure filamenteuse (Lambert *et al.*, 2006). La production de la gaine est sans doute régulée indépendamment de la régulation des gènes flagellaires (Voir la partie Discussion et Perspectives).

Dans le génome de *Brucella*, nous ne retrouvons les gènes que pour deux appendices pariétaux filamenteux connus : le flagelle et le système de sécrétion de type IV. Nous disposons au laboratoire d'un mutant *virB* dont l'opéron *virB* a été supprimé dans sa totalité (Nijskens *et al.*, 2008). La présence d'un filament dans le mutant *virB* montre que la structure observée n'est pas d'un système de sécrétion de type IV (Figure 45C).

6. FlbT contrôle la production de flagelline

Chez *C. crescentus*, FlbT est un régulateur qui se lie à l'ARNm de la flagelline et le déstabilise (Mangan *et al.*, 1999). FlbT est un point de contrôle entre le passage d'expression des gènes de classe III aux gènes de classe IV (voir point 4.2 de l'Introduction). La mutation de *flbT* de *C. crescentus* restaure la production de la flagelline dans les mutants flagellaires de classe III (Mangan *et al.*, 1999).

Contrairement à ces résultats, nous observons qu'un mutant *flbT* de *B. melitensis* ne produit plus du tout de flagelline (Figure 46C).

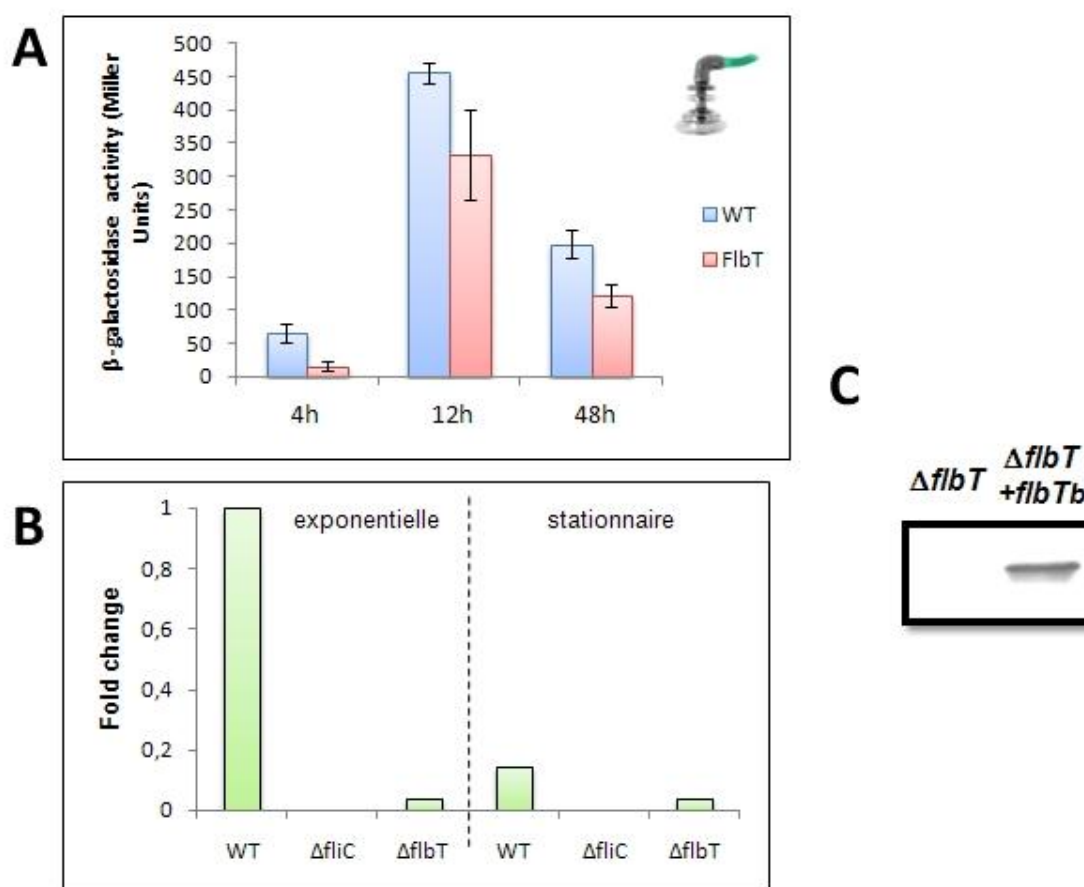


Figure 46 : Rôle de FlbT sur la flagelline. (A) Activité du promoteur de *fliC* en unité Miller par dosage de la β -galactosidase sur des échantillons prélevés après 4, 12 et 48 heures de croissance en milieu liquide dans la souche sauvage (WT) et le mutant *flbT* (FlbT). (B) Quantification de l'ARNm de la flagelline par Real Time PCR. Les résultats sont présentés pour une souche sauvage de *B. melitensis* (WT), un mutant *fliC* ($\Delta fliC$) et un mutant *flbT* ($\Delta flbT$) en début de phase exponentielle et en phase stationnaire. La différence par rapport à la souche sauvage WT en début de phase exponentielle est exprimée en ordonnée (Fold change). (C) Détection de la production de flagelline par Western Blot à l'aide d'un anticorps polyclonal anti-FliC dans le mutant *flbT* et un mutant *flbT* complémenté avec un pMR10 exprimant constitutivement *flbT* ($\Delta flbT + flbTb$). Les échantillons ont été récoltés au moment d'expression des gènes flagellaires (DO₆₀₀ entre 0.15 et 0.3) correspondant à la phase exponentielle en B ou à environ 12 heures de culture en A.

En complétant le mutant *flbT* avec un plasmide pMR10 produisant de manière constitutive FlbT, nous restaurons la production de flagelline (Figure 46C). L'absence de flagelline est donc une conséquence de l'absence de FlbT.

Pour mesurer l'effet de FlbT sur la production de la flagelline, nous avons fusionné le promoteur de *fliC* au gène rapporteur *lacZ* qui code pour l'enzyme β -galactosidase (β -gal). L'activité du promoteur de *fliC* a été quantifiée en unités Miller par dosage de la β -gal (Miller, 1972). Nous avons comparé l'activité β -gal dépendante du promoteur de *fliC* dans la souche sauvage et le mutant $\Delta flbT$ (Figure 46A).

En accord avec les résultats obtenus par Western Blot, nous constatons une baisse d'activité du promoteur de *fliC* dans le mutant *flbT* (Figure 46A). Néanmoins, nous détectons encore une activité non négligeable de β -galactosidase.

Pour quantifier un effet sur l'ARNm de la flagelline, nous avons utilisé la PCR en temps réel (RT-PCR) dans la souche sauvage *B. melitensis*, le mutant *fliC* et le mutant *flbT* (Figure 46B). Des échantillons ont été récoltés à une DO_{600} d'environ 0.2 et à une DO_{600} de 1. Les résultats montrent que la quantité d'ARNm de la flagelline chute dramatiquement dans un mutant *flbT*. Par homologie avec le système de *C. crescentus*, il est probable que FlbT se lie également à l'ARNm de la flagelline mais pour le stabiliser et permettre la traduction.

En conclusion, nous avons montré ici que FlbT est bien un régulateur de la flagelline de *B. melitensis* et que cette régulation s'exerce probablement à un niveau post-transcriptionnel.

7. La production transitoire de la flagelline est contrôlée par FlbT

En parallèle avec l'expression des gènes flagellaires, *B. melitensis* ne produit de la flagelline qu'en début de croissance et de manière transitoire (Fretin *et al.*, 2005). Il est possible que l'absence de production de flagelline en phase stationnaire soit due à une absence de FlbT. Si cette hypothèse est exacte, la production de flagelline en phase stationnaire doit alors être rétablie par l'apport de FlbT.

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons exprimé *flbT* en *trans* à l'aide d'un plasmide réplcatif pMR10 dans une souche sauvage de *B. melitensis*. De cette façon, le gène *flbT* est sous le contrôle du promoteur du gène *lac* d'*E.coli* et est exprimé de manière constitutive pendant toute la croissance.

Ensuite, des échantillons ont été récoltés après 8h et 24h de croissance pour vérifier la présence de flagelline (Figure 47).

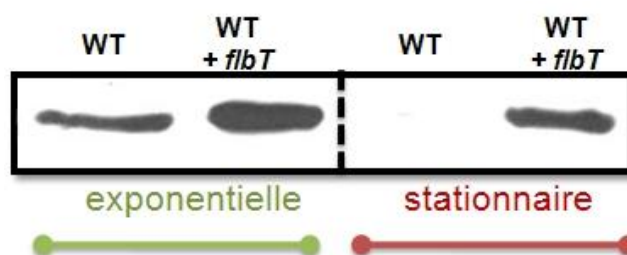


Figure 47 : Analyse de la production de flagelline par Western Blot avec un anticorps polyclonal anti-FliC pour la souche sauvage de *B. melitensis* (WT) et pour la souche sauvage produisant constitutivement FlbT (WT+*flbT*) après 8h (en vert) ou 24h (en rouge) de culture.

L'expression constitutive de *flbT* rétablit la production de flagelline en fin de croissance (Figure 47 dans la zone rouge). De plus, nous observons également que la quantité de flagelline produite est dépendante de l'expression de *flbT*. En effet, l'expression de *flbT* par un plasmide réplcatif en grand nombre de copies (WT+*flbT*) augmente la quantité de flagelline produite en phase exponentielle.

8. Existence d'un point de contrôle sur la flagelline des Rhizobiales

Le gène *flbT* est présent chez plusieurs α -protéobactéries comme *C. crescentus* mais également chez les Rhizobiales. La bactérie *Sinorhizobium meliloti* est une bactérie flagellée appartenant aux Rhizobiales et phylogénétiquement plus proche de *Brucella* que *C. crescentus*. Une analyse de la séquence peptidique de FlbT de *B. melitensis* par BLASTP montre que FlbT de *B. melitensis* est identique à 30% avec FlbT de *C. crescentus* et de 59% avec FlbT de *S. meliloti*.

Comme nous l'avons montré préalablement, la production de flagelline est restaurée dans un mutant *flbT* de *B. melitensis* par la complémentation de *flbT* de *B. melitensis* dans un plasmide réplcatif (Figure 46C).

Afin de déterminer si la régulation de la flagelline par FlbT décrite chez *Brucella* est conservée parmi les autres Rhizobiales, nous avons tenté de compléter un mutant *flbT* de *B. melitensis* avec un plasmide produisant de façon constitutive *flbT* de *C. crescentus* ou de *S. meliloti* (Figure 48). En supposant que le rôle de FlbT soit conservé chez les Rhizobiales, la production de flagelline du mutant *flbT* de *B. melitensis* pourrait être restaurée par FlbT de *S. meliloti*.

FtcR est un régulateur de classe I qui gouverne l'expression des gènes flagellaires chez les Rhizobiales (Rotter *et al.*, 2006) (Leonard *et al.*, 2007). Puisque la production de flagelline est également abolie dans un mutant du régulateur maître FtcR chez *B. melitensis* et *S. meliloti*, il est possible que FtcR contrôle indirectement la production de la flagelline via un contrôle sur *flbT*. Dans ce cas, l'absence de flagelline dans un mutant *ftcR* serait due à une absence de production de FlbT.

Pour déterminer si FtcR régule directement la production de flagelline ou indirectement par l'intermédiaire de FlbT, nous avons également complémenté le mutant *ftcR* avec FlbT de *B. melitensis*. Pour vérifier si ce rôle est conservé par les Rhizobiales, nous avons également complémenté le mutant *ftcR* avec le gène *flbT* de *S. meliloti* et de *C. crescentus* (Figure 48).

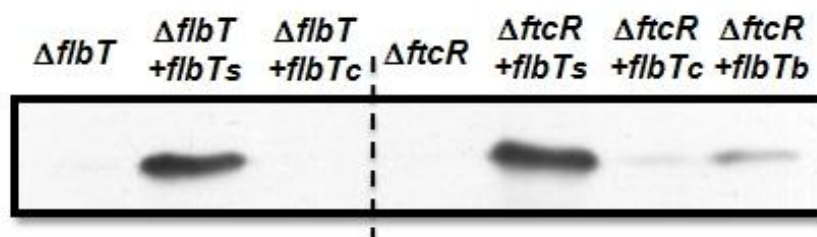


Figure 48 : Analyse de la production de flagelline par Western Blot avec un anticorps polyclonal anti-FliC. Résultat chez le mutant *flbT* ($\Delta flbT$) complémenté avec un pMR10 exprimant de façon constitutive *flbT* de *Sinorhizobium meliloti* ($\Delta flbT + flbTs$) ou de *Caulobacter crescentus* ($\Delta flbT + flbTc$). Résultat chez le mutant *ftcR* ($\Delta ftcR$), complémenté avec un plasmide pMR10 exprimant de façon constitutive *flbT* de *Sinorhizobium meliloti* ($\Delta ftcR + flbTs$), de *Caulobacter crescentus* ($\Delta ftcR + flbTc$) ou de *Brucella melitensis* ($\Delta ftcR + flbTb$).

Premièrement, nous constatons que la production de flagelline est restaurée lorsque le mutant *flbT* de *B. melitensis* est complémenté avec le gène *flbT* de *S. meliloti* (Figure 48 $\Delta flbT + flbTs$). Ce résultat démontre que FlbT de *S. meliloti* possède le même rôle que FlbT de *Brucella*. De manière générale, cela tend à montrer que FlbT aurait un rôle d'activateur sur la production de flagelline chez les Rhizobiales.

L'absence de production de flagelline lors de la complémentation avec *flbT* de *C. crescentus* montre que le rôle sur la flagelline semble restreint aux Rhizobiales. En plus notons que FlbT de *C. crescentus* a un effet opposé et inhibe la production de flagelline (Mangan *et al.*, 1999).

Deuxièmement, nos résultats montrent que la complémentation du mutant *ftcR* avec *flbT* de *B. melitensis* rétablit la production de flagelline (Figure 48 et 49A). Il est donc vraisemblable que l'absence de flagelline dans un mutant *ftcR* soit le résultat d'une absence de production de FlbT. FlbT agirait donc comme un point de contrôle similaire à celui de *C. crescentus* entre les gènes de classe III (structure basale et le coude) et les gènes de classe IV (les flagellines).

Nous pouvons donc conclure que *ftcR* est un gène de classe I, que *flbT* serait un gène de classe II contrôlé par *ftcR*, et responsable de la production de la flagelline appartenant à la classe III (voir la partie Conclusion). Puisque nous montrons que la complémentation du mutant *ftcR* avec *flbT* de *S. meliloti* restaure également la production de flagelline, nous pouvons aussi en déduire que ce point de contrôle est conservé chez *S. meliloti* et probablement chez les autres Rhizobiales.

La production de FlbT de *C. crescentus* ne restaure pas la flagelline dans le mutant *ftcR* et prouve une fois de plus la divergence entre le système flagellaire des Rhizobiales comparé aux autres α -protéobactéries. En conclusion, nous pouvons supposer qu'il existe une cascade de régulation flagellaire hiérarchique spécifique des Rhizobiales.

9. FlaF est un inhibiteur de la production de flagelline chez *Brucella*

Chez *C. crescentus*, FlbT possède un antagoniste nommé FlaF (Llewellyn *et al.*, 2005). Alors que FlbT déstabilise l'ARNm de la flagelline, FlaF permettrait la production de flagelline en stabilisant la structure secondaire de l'ARNm, et favoriserait sa traduction (Voir la partie Introduction point 4.2). FlaF agit donc comme un activateur sur la production de flagelline.

Le gène *flaF* est également présent chez *B. melitensis*. Pour tester de façon préliminaire le rôle de FlaF sur la flagelline de *Brucella*, nous avons cloné le gène *flaF* dans un plasmide répliquatif pMR10 et produit constitutivement FlaF dans une souche sauvage de *B. melitensis* et dans un mutant *ftcR* après 8 heures de culture en milieu riche (Figure 49A).



Figure 49 : Rôle de FlaF sur la production de flagelline. (A) Détection de la flagelline de *B. melitensis* avec un anticorps polyclonal anti-FliC par Western Blot. Des échantillons d'un mutant *ftcR* ($\Delta ftcR$) et du même mutant complétement avec *flbT* ($\Delta ftcR + flbT$) ou *flaF* ($\Delta ftcR + flaF$) ont été récoltés en début de phase exponentielle après 8h de culture en milieu liquide riche. (B) FlaF a été produit de manière constitutive par un plasmide pMR10 dans la souche sauvage (WT $+flaF$) et comparé à la souche sauvage de *B. melitensis* sans plasmide (WT) après 8h de culture en milieu liquide riche. (C) Quantification de l'ARNm de *flaF* par Real-Time PCR dans une souche sauvage de *B. melitensis* (WT), un mutant *fliC* ($\Delta fliC$) et un mutant *flbT* ($\Delta flbT$). La différence présentée en ordonnée (Fold change) est la quantification de l'ARNm de *flaF* pour les mutants comparés à la souche sauvage étalonée à 1.

Afin de déterminer si FlaF active la production de flagelline comme chez *C. crescentus*, nous avons recommencé l'expérience décrite à la Figure 47 en début de phase exponentielle, en complétant le mutant *flcR* avec le gène *flaF* (Figure 49A). Contrairement à FlbT qui restaure la production de flagelline dans un mutant *flcR*, *flaF* ne restaure pas la production de flagelline.

Cependant, nous constatons que l'expression de FlaF dans une souche sauvage de *B. melitensis* en début de phase exponentielle inhibe la production de flagelline (Figure 49B). En effet, bien que la souche sauvage produise normalement de la flagelline en début de phase exponentielle, celle-ci disparaît dès que *flaF* est exprimé.

L'ARNm de *flaF* a été quantifié par RT-PCR dans un mutant *fliC* et *flbT* par rapport à la souche sauvage *B. melitensis* (Figure 49C). Bien que la quantité d'ARNm de *flaF* soit similaire entre la souche sauvage et le mutant *fliC*, la quantité d'ARNm est plus importante dans un mutant *flbT*. Pour rappel, le gène *flbT* est juste en aval de *flaF* (Figure 42). Puisqu'il est probable que *flaF* et *flbT* soient en opéron, il est possible que FlbT déstabilise l'ARNm de son propre opéron.

Nos résultats démontrent que FlaF et FlbT de *Brucella* contrôlent la production de flagelline comme chez *C. crescentus*. Néanmoins, l'action de ces deux régulateurs est inversée par rapport au modèle décrit chez *C. crescentus*.

Chez *Brucella*, FlbT active la production de flagelline, probablement par stabilisation de l'ARNm, alors que nos résultats préliminaires montrent que FlaF inhibe la production de flagelline. Ces données permettent de montrer l'existence d'un point de contrôle sur la production de flagelline de *Brucella* et de classer la flagelline dans une troisième classe flagellaire (Voir la partie Conclusion).

10. Rôle des facteurs sigma sur la production de la flagelline de *Brucella*

Les facteurs sigma sont impliqués dans toute une série de processus de régulation, ce qui implique aussi une régulation des systèmes flagellaires (Chilcott and Hughes, 2000). Par exemple, chez *S. typhimurium* et *E. coli*, le facteur sigma 28 et son anti-activateur flagellaire FlgM sont spécifiquement liés à la régulation du flagelle (Chilcott and Hughes, 2000).

Dans le modèle de régulation flagellaire, la flagelline est très souvent régulée par un facteur sigma 28 ou 54. Bien que *Brucella* ne possède pas de facteur sigma 28, il a récemment été démontré que le facteur sigma RpoE1 contrôle indirectement la production de la protéine FlgE (Delory *et al.*, 2006).

Afin de détecter les facteurs sigma impliqués dans la régulation de la flagelline chez *Brucella*, nous avons analysé la production de la flagelline dans les mutants² sigma *rpoE1*, *rpoE2*, *rpoH1*, *rpoH2* et *rpoN* par rapport à la souche sauvage à l'aide d'un Western Blot, en début (EP) et en fin (SP) de croissance (Figure 50).

² Mutants créés par remplacement du gène cible par un gène de résistance à la kanamycine.

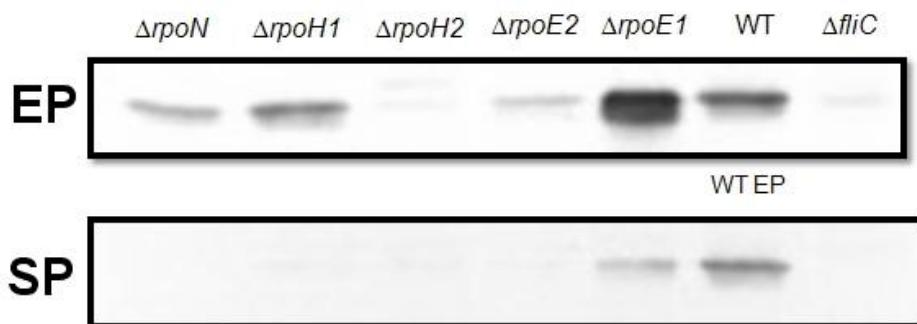


Figure 50 : Détection de la flagelline dans les mutants des facteurs sigma $\Delta rpoE1$, $\Delta rpoE2$, $\Delta rpoH1$, $\Delta rpoH2$ et $\Delta rpoN$ par Western Blot à l'aide d'un anticorps anti-FliC en début de croissance (début de phase exponentielle : EP) et en fin de croissance (phase stationnaire : SP) en culture liquide. Contrôle négatif, mutant *fliC* ($\Delta fliC$); contrôle positif, souche sauvage en début de croissance, c'est-à-dire en début de phase exponentielle (WT et WT EP).

Nous avons utilisé un échantillon de la souche sauvage *B. melitensis* et du mutant *fliC* respectivement comme contrôle positif et contrôle négatif. Afin de pouvoir comparer les échantillons pris au début et en fin de croissance, nous avons utilisé le même échantillon comme contrôle positif pour les deux Westerns Blot, c'est-à-dire récolté au début de croissance (Figure 50, WT EP).

Nous observons que les deux facteurs sigma RpoH2 et RpoE1 jouent un rôle sur la production de la flagelline. En effet, la production de flagelline est abolie dans le mutant *rpoH2* et surproduite dans le mutant *rpoE1*. Ces résultats sont comparables à ceux décrits pour la production de la protéine FlgE et l'activité du promoteur de *fliF* (Delory *et al.*, 2006).

Notons que le mutant *rpoH2* a un caractère pléiotropique et est sans doute impliqué dans plusieurs mécanismes de défense contre le stress décrits dans la thèse de Marie Delory (Delory, 2006). Il semblerait donc que l'effet de RpoH2 sur les gènes flagellaires ne soit pas spécifique.

11. Le facteur sigma RpoE1 est impliqué dans l'inhibition du système flagellaire de *Brucella*

Afin de préciser l'effet de RpoE1 sur la flagelline, nous avons réitéré l'expérience en prélevant des extraits totaux de protéines après 4, 8, 12, 24 et 38 heures de croissance en milieu liquide (Figure 51B).

Cette expérience nous a permis de suivre la production de la flagelline dans le mutant $\Delta rpoE1$ tout au long de la courbe de croissance. Comme attendu, la flagelline est détectée dans la souche sauvage en début de phase exponentielle.

Elle disparaît ensuite en pleine phase exponentielle (24h) et stationnaire (38h). Les résultats obtenus avec le mutant $\Delta rpoE1$ confirment la présence d'une surproduction de flagelline et la présence prolongée de celle-ci au cours de la croissance (Figure 51B).

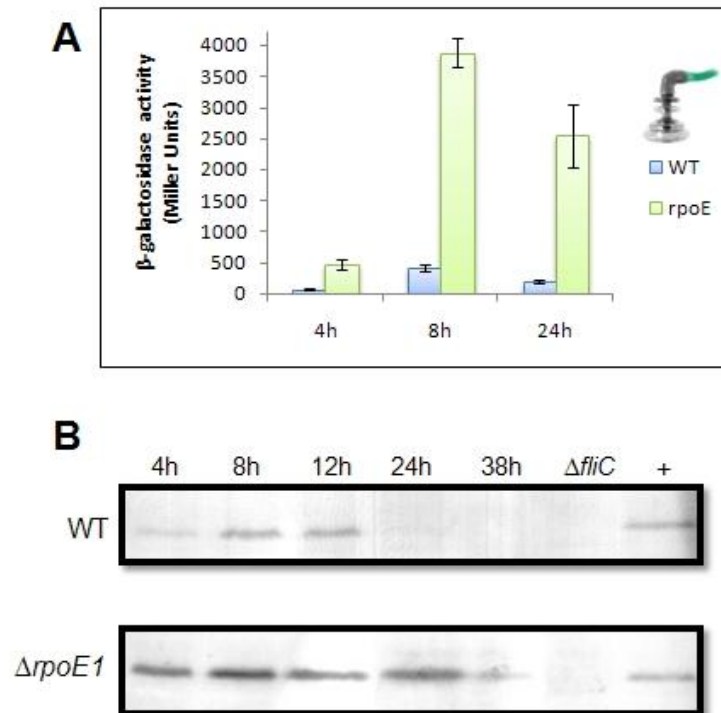


Figure 51 : (A) Activité du promoteur de *fliC* dans la souche sauvage (en bleu) et le mutant *rpoE1* (en vert) par dosage de la β -galactosidase au début (4h), milieu (8h) et fin (24h) de croissance en culture liquide. Les résultats sont présentés en unité Miller. La partie verte de la petite structure flagellaire représente FliC. (B) Détection de la flagelline dans la souche sauvage de *Brucella* (WT) et dans le mutant *rpoE1* après 4, 8, 12, 24, 32 et 48 heures de croissance en milieu liquide riche. Contrôle positif : même échantillon de la souche sauvage récolté après 6 heures de culture.

En utilisant un plasmide réplcatif utilisé précédemment contenant le promoteur de *fliC* fusionné au gène de la β -galactosidase (point 6, Figure 46), nous avons quantifié l'activité transcriptionnelle du promoteur de *fliC* par dosage de la β -gal en début de phase exponentielle

(4h), en phase exponentielle (8h) et en phase stationnaire (32h) dans la souche sauvage et le mutant *rpoE1* (Figure 51A).

Nous observons une induction transitoire de l'activité du promoteur de *fliC* en début de phase exponentielle pour la souche sauvage WT. Les données obtenues pour le mutant $\Delta rpoE1$ nous indiquent qu'il y a une forte augmentation de l'activité du promoteur de *fliC* dans le mutant $\Delta rpoE1$ par rapport à la WT.

Bien que nous observions ensuite une diminution progressive de l'activité de promoteur de *fliC* en phases exponentielle et stationnaire pour le mutant, cette activité reste néanmoins beaucoup plus élevée que celle obtenue dans la souche sauvage (Figure 51A).

En utilisant un plasmide contenant le promoteur de *flgE* fusionné à la β -galactosidase, nous constatons un résultat similaire. Comme cela fut décrit auparavant dans la thèse de Marie Delory (Delory, 2006), nous observons une surproduction de la protéine FlgE qui concorde avec la suractivité du promoteur de *flgE* chez le mutant $\Delta rpoE1$ (Figure 52).

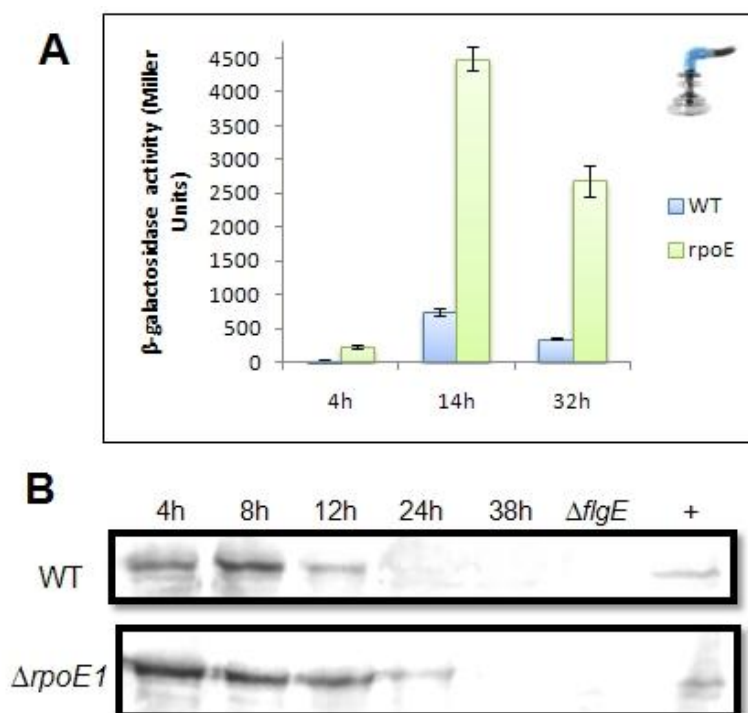


Figure 52 : (A) Analyse de l'activité du promoteur de *flgE* dans la souche sauvage (WT) et le mutant *rpoE1* (*rpoE*) par dosage de la β -galactosidase au début (4h), milieu (14h) et fin (32h) de croissance en culture liquide. Les résultats sont présentés en unité Miller. (B) Détection de la protéine FlgE dans la souche sauvage de *B. melitensis* (WT) et dans le mutant *rpoE1* après 4, 8, 12, 24, 32 et 48 heures de croissance en milieu liquide riche. Contrôle positif, même échantillon de la souche sauvage récolté après 6 heures de culture et utilisé dans la figure 51.

Afin de déterminer si d'autres gènes sont touchés par l'action de RpoE1, nous avons effectué une Real-Time PCR pour quantifier l'ARNm des gènes *fliF*, *flgE*, *fliC*, *flbT* et *flaF* dans un mutant $\Delta rpoE1$ par rapport à une souche sauvage de *B. melitensis* (Figure 53). Pour

une facilité de visualisation, nous avons étalonné nos résultats pour une souche sauvage normalisée à 1.

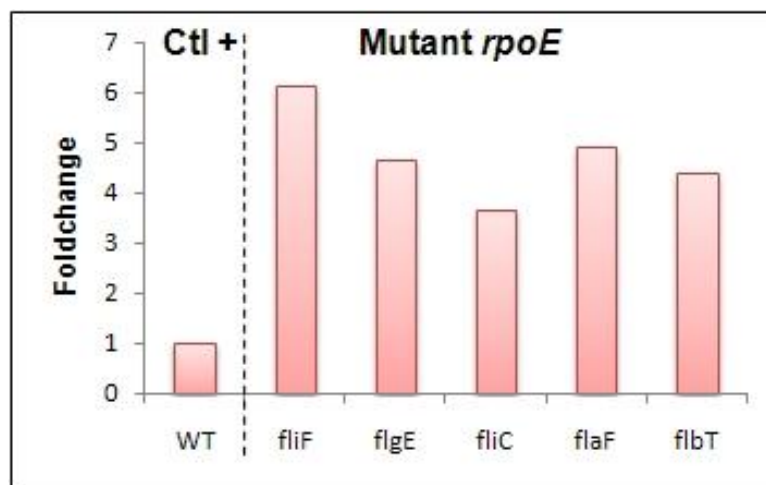


Figure 53 : Présence plus élevée d'ARNm des gènes flagellaires dans un mutant *rpoE1*. Quantification de l'ARNm des gènes *fliF*, *flgE*, *fliC*, *flaF* et *flbT* dans le mutant *rpoE1* par Real-Time PCR en phase stationnaire. Les résultats présentés ont été homogénéisés en les comparant avec le résultat de la souche sauvage *B. melitensis* (WT) étalonné à 1 pour chaque gène. Le rapport de la quantité d'ARNm de chaque gène flagellaire dans un mutant $\Delta rpoE1$ par rapport à une souche sauvage est quantifié en ordonnée (Foldchange).

Nous constatons que la quantité d'ARNm pour tous les gènes flagellaires testés est supérieure à la quantité d'ARNm retrouvée dans une souche sauvage de *B. melitensis*. Nous pouvons donc conclure que RpoE1 est un inhibiteur de l'expression de tous les gènes flagellaires. Son action sur les gènes flagellaires est sans doute indirecte et est peut-être liée à un répresseur transcriptionnel à la base de la régulation du système flagellaire chez *Brucella* (Voir partie Discussion et Perspectives).

Pour savoir si cette surproduction de protéines a un effet sur la structure flagellaire nous avons aussi analysé le mutant $\Delta rpoE1$ en microscopie électronique à transmission en utilisant la même méthode que précédemment (Figure 54).

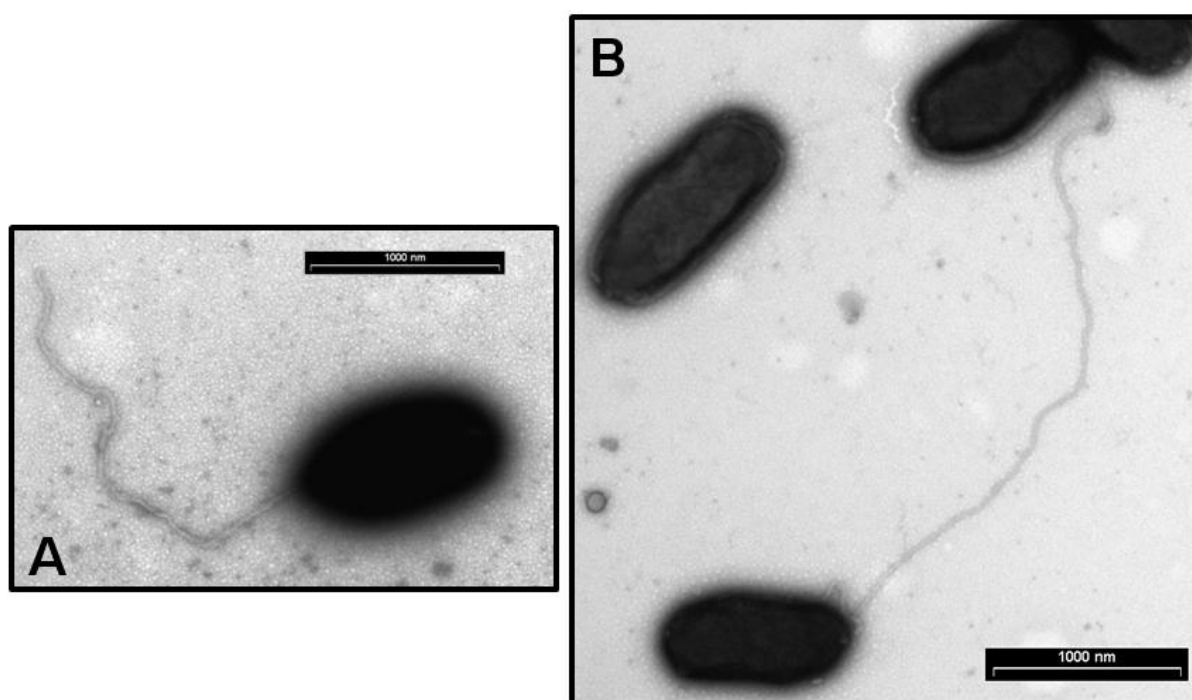


Figure 54 : Photos en microscopie électronique à transmission de la souche sauvage de *B. melitensis* (A) et du mutant $\Delta rpoE1$ en début de croissance en milieu riche liquide (B). Les échantillons sont colorés à l'acétate d'uranyle 2% et les barres noires correspondent à 1 μ m.

Nous n'observons pas de différence quant au nombre de flagelles par bactérie ou dans la population, par contre le filament est souvent beaucoup plus long pour le mutant $\Delta rpoE1$. Il semblerait donc que RpoE1 ait un effet sur la longueur de celui-ci.

12. Analyse *in silico* de régulateurs flagellaires et de cibles dans les promoteurs flagellaires

La disposition d'un nombre sans cesse croissant de séquences de génomes bactériens et leur analyse bioinformatique nous permet aujourd'hui d'analyser *in silico* le génome de *Brucella* (Yu *et al.*, 2007).

Le but de cette analyse *in silico* est de faire ressortir des cibles potentielles de la régulation flagellaire afin de dessiner un schéma de régulation pour de futures recherches. Notons qu'il n'est nullement envisagé dans notre cas de faire une étude précise bioinformatique du génome de *Brucella*, ce qui dépasserait le cadre de cette thèse.

A partir de données bibliographiques, nous avons sélectionné les régulateurs impliqués dans la régulation des promoteurs flagellaires et pour lesquels nous avons un site consensus décrit.

Afin d'affiner notre recherche, nous avons ciblé les régulateurs flagellaires présents chez les α -protéobactéries et qui possèdent un homologue chez *Brucella*. Parmi ceux-ci nous avons retenus CtrA (le régulateur du cycle cellulaire et régulateur maître des gènes flagellaires chez *C. crescentus*), FtcR (le régulateur flagellaire de *Brucella*), IHF (un régulateur agissant sur la structure de l'ADN), et les facteurs sigma RpoE1 et $\sigma 70$.

En partant des séquences consensus décrites dans la bibliographie, nous avons examiné le génome de *Brucella* à l'aide du programme RSAT (Thomas-Chollier *et al.*, 2008) (Turatsinze *et al.*, 2008) (Defrance *et al.*, 2008). Un schéma récapitulatif est disponible à la fin de cette partie (Figure 60).

12.1. Le régulateur CtrA

L'analyse *in silico* du génome de *Brucella* à la recherche de sites de liaison du régulateur CtrA a montré la présence potentielle de ces séquences dans des promoteurs flagellaires (Hallez *et al.*, 2004).

Nous avons recommencé cette recherche en ciblant uniquement les promoteurs flagellaires et en utilisant les 3 séquences consensus de CtrA [TTAAC], [TTAA(N₇)TTAAC] et [TTAACCAT] avec une possibilité de substitution d'une base via RSAT pour les deux derniers consensus (Voir Annexe IV).

Nous retrouvons ces sites consensus dans le promoteur des gènes flagellaires *flgB*, *flhA*, *flgJ*, *ftcR*, *tetR* et l'ORF hypothétique BMEII1102 situés dans le locus flagellaire (Figure 55).

Consensus CtrA	TTAA(N ₇)TTAAC
<i>ftcR</i>	TTAA(N ₇)TCATT
<i>flgJ</i>	TTAT(N ₇)TTAAC
<i>flgB</i>	TTAA(N ₇)TAAAG
<i>flhA</i>	TTAA(N ₇)CGGCC
<i>tetR</i>	TTAA(N ₇)GCTTT
<i>bmeii1102</i>	TTAT(N ₇)TTAAC

Figure 55 : Alignement de séquences nucléotidiques des promoteurs des gènes appartenant aux loci flagellaires avec le consensus de liaison de CtrA. Les bases surlignées de bleu et rouge sont identiques au consensus. Les bases surlignées en rouge sont conservées dans toutes les séquences présentées.

12.2. Le régulateur FtcR

Le régulateur flagellaire FtcR est le régulateur qui déclenche l'expression des gènes flagellaires chez *Brucella* et se lie au promoteur de *fliF* (Leonard *et al.*, 2007).

L'homologue de ce régulateur chez *S. meliloti* (le régulateur Rem), a également été étudié et a un consensus défini (Rotter *et al.*, 2006). Chez *S. meliloti* il a été démontré expérimentalement que Rem se liait au promoteur de *fliF*, *flgB* et de l'ORF 38 (Rotter *et al.*, 2006).

Pour trouver les cibles potentielles de FtcR, nous avons fait une recherche avec RSAT sur tout le génome de *B. melitensis* en utilisant le consensus CGC(N₀₋₁)AAGN(A/T)T établi à partir du consensus décrit par Rotter *et al* (Rotter *et al.*, 2006). La liste des gènes cibles potentiels est décrite dans l'annexe III. Sur les 40 gènes cibles potentiels obtenus, nous retrouvons les gènes flagellaires *fliF*, *flhA* et *flgB* (Figure 56).

Consensus FtcR	C	G	C	(N ₀₋₁)	A	A	G	N	W	T
<i>fliF</i>	C	G	C	(N ₀₋₁)	A	A	G	C	T	T
<i>flhA</i>	C	G	C	(N ₀₋₁)	A	A	G	C	T	T
<i>flgB</i>	C	G	C	(N ₀₋₁)	A	A	G	C	T	T
BMEII0153	C	C	G	(N ₀₋₁)	G	A	G	C	T	G
<i>ftcr</i>	C	G	C	(N ₀₋₁)	A	A	G	G	G	A
<i>orf28</i>	C	C	G	(N ₀₋₁)	T	T	G	C	A	T
<i>rem</i>	C	A	T	(N ₀₋₁)	A	T	G	T	T	A

Figure 56 : Alignement de séquences nucléotidiques des promoteurs des gènes appartenant aux loci flagellaires avec le consensus de liaison de FtcR. L'ORF BMEII0153 de *B. melitensis* est l'homologue de l'ORF 38 de *S. meliloti*. Les bases surlignées de bleu, rouge et vert sont identiques au consensus. Les bases surlignées en rouge sont conservées dans toutes les séquences présentées. Les bases surlignées en vert sont conservées dans toutes les séquences de *Brucella*. Les séquences dans le cadre pointillé appartiennent à *S. meliloti* pour comparaison. Dans le consensus W est utilisé pour la base A ou T, et N pour toutes les bases.

12.3. L'IHF

Le régulateur IHF (Integration Host Factor) se lie à une séquence spécifique de l'ADN et agit en modifiant sa structure (Rice *et al.*, 1996). Un homologue d'IHF a été décrit chez *Brucella* et régule l'opéron *virB* (Sieira *et al.*, 2004).

Comme ce régulateur est aussi décrit pour réguler l'expression des gènes flagellaires chez *C. crescentus* (Muir and Gober, 2005) et *E. coli* (Yona-Nadler *et al.*, 2003), nous avons analysé l'entièreté du génome en utilisant le consensus (C/T)AAN₄TTGAT(A/T) à l'aide du programme RSAT (Figure 57).

Suite à cette analyse, nous retrouvons uniquement le gène flagellaire *ftcR* parmi les 37 gènes potentiellement régulés par IHF (voir Annexe II).

Consensus IHF <i>Brucella</i>	YAANNNTTGATW
<i>ftcR</i>	TAA C ATATTGATT
<i>virB B. abortus</i>	TAA A AAAGAAATTT
Consensus IHF <i>E. coli</i>	WATCAANNNTTR
IHF site <i>C. crescentus</i>	AAT C ATGGGATGA
IHF site <i>R. prowazekii</i>	AAT C AGTATTTTA

Figure 57 : Alignement de séquences des promoteurs de *ftcR* et *virB* de *B. melitensis* avec le consensus de liaison d'IHF. Les bases surlignées de bleu et rouge sont identiques au consensus chez *Brucella*. Les bases surlignées en rouge sont conservées dans toutes les séquences présentées. Les séquences dans le cadre pointillé appartiennent à *E. coli*, *C. crescentus* et *R. prowazekii* pour comparaison (Brassinga et al., 2002). W=A ou T, Y=C ou T, R=A ou G, et N= toutes les bases.

12.4. Les facteurs sigma

Parmi les facteurs sigma analysés, nous avons choisi le facteur principal sigma 70, et le facteur sigma RpoE1 pour son action démontrée sur les gènes flagellaires (Figure 50). Les autres facteurs sigma ne seront pas analysés ici.

12.4.1. Le facteur sigma 70

Parmi les mutants sigma de *Brucella* que nous avons étudiés lors de l'analyse de la production de la flagelline, nous n'avons pas pu étudier le rôle du facteur sigma 70 car celui-ci étant essentiel n'a pu être construit (Delory et al., 2006).

Cependant, à partir du consensus du sigma 70 [TTGACA(N₁₅₋₂₁)TATAAT] (Harley and Reynolds, 1987) décrit chez *E. coli* et en l'adaptant sur RSAT avec le consensus [TT(G/T)A(A/C)(N₁₅₋₂₀)TA(A/T)AAT], nous retrouvons le site de liaison au sigma 70 [TTGACG(N₁₈)TATAAT] dans le promoteur de la flagelline (Figure 58).

Consensus $\sigma 70$ <i>Brucella</i>	TTKAMN (N ₁₅₋₁₉)	TAWAAT
<i>fliC</i>	TT GACG (N ₁₈)	TATAAT
Consensus $\sigma 70$ <i>E. coli</i>	TTGACA (N ₁₇)	TATAAT
<i>flaB B. burgdorferi</i>	TTCTTT (N ₁₇)	TATTCT
<i>flaA B. burgdorferi</i>	TTAAAG (N ₁₇)	TAAAT

Figure 58 : Alignement de séquences du promoteur de *fliC* avec le consensus de liaison du $\sigma 70$. Les bases surlignées en bleu et rouge sont identiques au consensus de *Brucella*. Les bases surlignées en rouge sont conservées dans toutes les séquences présentées. Pour comparaison, les séquences dans le cadre pointillé sont le consensus $\sigma 70$ de *E. coli* et les promoteurs des flagellines *flaA* et *flaB* de *B. burgdorferi*. W=A ou T, M=C ou A, K=T ou G, et N= toutes les bases.

Notons que le site consensus a été adapté en fonction des récentes recherches à large échelle de sites consensus du sigma 70 dans plusieurs dizaines de génomes différents (Sinoquet *et al.*, 2008) (Huerta *et al.*, 2006) (MacLellan *et al.*, 2006).

12.4.2. Le facteur sigma RpoE

La mutation de *rpoE1* (BMEI0371) chez *B. melitensis* provoque une surproduction des gènes flagellaires (voir point 11). Il est probable que RpoE1 active la transcription d'un répresseur des gènes flagellaires. La séquence consensus de liaison du facteur RpoE à l'ADN est connue pour *E. coli* (Rhodius *et al.*, 2006).

A l'aide du consensus [BRAACBW(N₁₅₋₁₉)TCNDW(N₅₋₆)R], nous avons également exploré le génome de *B. melitensis* à la recherche d'un répresseur flagellaire potentiel.

Parmi les 51 gènes cibles potentiels sélectionnés, nous retrouvons 4 régulateurs transcriptionnels (voir Annexe I). Ces 4 régulateurs sont de la famille des régulateurs à 2 composants (BMEI0372), de la famille GntR (BMEII0475), de la famille AsnC (BMEII0518) et de la famille TetR (BMEII0804).

Nous retrouvons également un site consensus dans le promoteur de *rpoE1*, ce qui laisse penser que RpoE1 s'autorégule comme cela est décrit chez *E.coli* (Rhodius *et al.*, 2006) (Figure 59).

Consensus RpoE <i>Brucella</i>	BRAACBW (N ₁₅₋₁₈) TCNDW (N ₅₋₆) R
<i>rpoE Brucella</i>	GAAACTT (N ₁₅) TCTAT (N ₅) A
Consensus RpoE <i>E.coli</i>	GGAACCTT (N ₁₆) TCAAA
<i>rpoE E.coli</i>	GGAACCTT (N ₁₆) TCTAA (N ₆) G

Figure 59 : Alignement de séquences du promoteur de *rpoE1* de *Brucella* avec le consensus de liaison de RpoE. Pour comparaison, les séquences dans le cadre pointillé sont le consensus de RpoE de *E. coli* et le promoteur de *rpoE*. W=A ou T, B=G, C ou T, R=A ou G, D=G,A ou T et N= toutes les bases.

Sur base de cette analyse bioinformatique préliminaire, nous avons regroupé les promoteurs flagellaires potentiellement régulés par l'un de ces régulateurs sur un schéma récapitulatif (Figure 60). Ce schéma a pour but de nous guider pour la compréhension de la régulation du système flagellaire de *Brucella*.

En perspective, une analyse plus poussée et une validation expérimentale des propositions pourraient être effectuées.

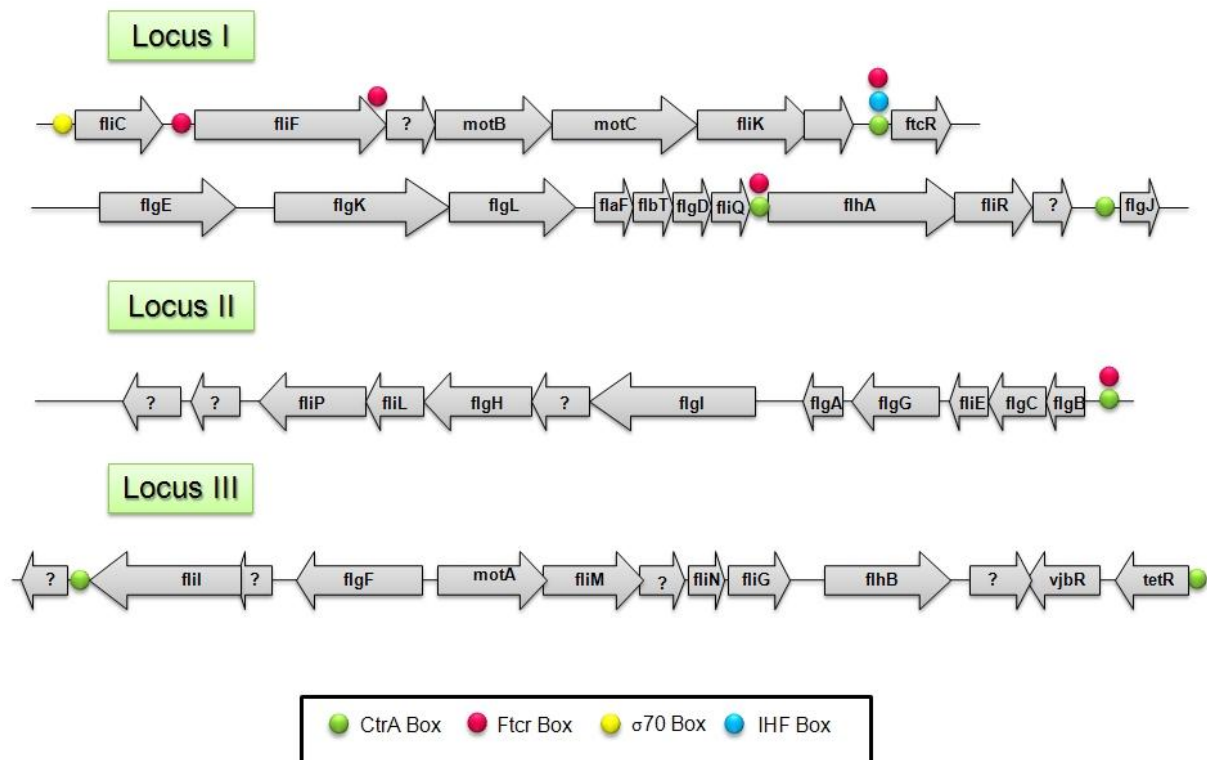


Figure 60 : Schéma récapitulatif des 3 loci flagellaires avec les promoteurs contenant des séquences de liaison potentielles à CtrA (vert), FtcR (rouge), sigma 70 (jaune) et IHF (bleu).

PARTIE IV

DISCUSSION

IV DISCUSSION

Le travail effectué au cours de cette thèse a permis d'éclairer nos connaissances sur le flagelle de *Brucella*. Dans cette partie, nous discuterons du rôle et de la régulation du flagelle chez *Brucella* à la lumière de nos résultats.

1. Structure et rôle du flagelle de *Brucella melitensis*

Premièrement, nous avons montré pour la première fois la structure du flagelle de *Brucella*. Nous discuterons de la particularité de cette structure flagellaire et du rôle potentiel à partir des connaissances actuelles sur ce type de flagelle.

1.1. Structure du flagelle de *Brucella*

Depuis sa découverte en 1887 par Sir David Bruce, *Brucella* est décrite pour être non mobile et non flagellée. Néanmoins, le séquençage de son génome a permis de mettre en évidence la présence de gènes flagellaires. Depuis, les récentes recherches menées sur ces gènes ont montré que le gène *fliF* (codant l'anneau MS) était actif à une DO₆₀₀ située entre 0.15 et 0.3 et que les protéines flagellaires FlgE et FliC étaient produites à ce moment (Ferooz, 2003) (Fretin *et al.*, 2005). Suite à ces travaux, nous avons réussi à observer des *Brucella melitensis* flagellées récoltées à une DO₆₀₀ de 0.15 et 0.3 dans une culture liquide.

Uniquement à ce stade de croissance, nous avons pu détecter la présence de *Brucella* produisant un flagelle polaire de type gainé (Fretin *et al.*, 2005). La présence d'une gaine autour d'un flagelle n'est pas inhabituelle puisqu'elle est décrite chez *Vibrio cholerae* (Yang *et al.*, 1977) (Fuerst and Perry, 1988) (McCarter, 2001), *Vibrio anguillarum* (Norqvist and Wolf-Watz, 1993), *Bdellovibrio bacteriovorus* (Thomashow and Rittenberg, 1985), et *Helicobacter pylori* (Jones *et al.*, 1997) mais est atypique pour un membre de la famille des α -protéobactéries (review Sjoblad (Sjoblad *et al.*, 1983)).

Le bout du flagelle de *Brucella* possède souvent une structure particulière en forme de « club de golf ». Ceci est un argument supplémentaire à la présence d'un flagelle de type gainé chez *Brucella* puisque ce genre de structure distale est fréquemment rencontré chez les flagelles de type gainé. Par exemple, nous retrouvons cette structure particulière au bout du flagelle de *Vibrio fischeri* ou d'autres espèces de *Vibrio* (Millikan and Ruby, 2004) (Allen and Baumann, 1971).

Nous avons également tenté d'observer le flagelle de plusieurs mutants flagellaires au microscope électronique à transmission. Contrairement à ce que nous attendions, nous observons que les mutants flagellaires *ftcR*, *fliF*, *flgE* et *fliC* produisent toujours une structure filamenteuse. La production d'une gaine vide pourrait être à l'origine de cette structure. Puisque l'absence des protéines de structure FliF, FlgE et FliC n'altère pas la production de la gaine, nous concluons que la régulation de l'assemblage de la structure flagellaire n'est pas liée à la production de la gaine.

Pourtant, puisque le flagelle de *Brucella* est gainé, le flagelle et la gaine sont produits en même temps. Bien que FtcR soit le régulateur maître des gènes flagellaires chez les α -protéobactéries, celui-ci ne contrôle probablement pas la production de la gaine puisque le mutant *ftcR* produit encore cette structure. Il est donc probable que d'autres régulateurs interviennent pour faire le lien entre la production de la gaine et de la structure flagellaire.

Notons que chez certaines bactéries flagellées produisant également une gaine, ce type de phénomène est également décrit. Par exemple, un mutant de la flagelline de *Bdellovibrio bacteriovorus* produit toujours un appendice filamenteux déstructuré à cause de la persistance de la production de la gaine (Lambert *et al.*, 2006).

La présence d'une structure produite par la gaine dans des mutants flagellaires d'*Helicobacter pylori* est également décrite (Schirm *et al.*, 2003) (Ryan *et al.*, 2005). Chez cette bactérie aussi, la gaine est toujours produite dans un mutant des deux flagellines FlaA et FlaB (Josenhans *et al.*, 1995). Chez différentes espèces de *Vibrio*, il semblerait que la production de la gaine seule produise aussi certaines structures tubulaires différentes et indépendantes du filament (Allen and Baumann, 1971) (Millikan and Ruby, 2004).

L'étude de la gaine entourant le flagelle de *Vibrio parahaemolyticus* montre que la gaine est en continuité avec la membrane externe et contient du LPS (Allen and Baumann, 1971) (Fuerst and Perry, 1988). Néanmoins, on démontre chez *Vibrio cholerae* et *Helicobacter pylori* que la composition de cette gaine est différente du reste de la membrane bactérienne (Hranitzky *et al.*, 1980) (Doig and Trust, 1994). La gaine peut donc être considérée comme une structure particulière indépendante du flagelle ou du reste des enveloppes bactériennes.

Bien que la présence d'une gaine autour de certains flagelles soit connue depuis longtemps, on ne connaît que peu de choses sur la composition, la régulation et le rôle de cette gaine (McCarter, 2001) (Sjoblad *et al.*, 1983). Par exemple, à l'heure actuelle nous ne savons toujours pas si la gaine tourne avec le filament ou si le filament tourne à l'intérieur de la gaine (Fuerst, 1980).

1.2. Rôle de la gaine

Chez toutes les bactéries produisant un flagelle gainé, le rôle de la gaine reste aujourd'hui encore un mystère (Sjoblad *et al.*, 1983) (McCarter, 2001).

Chez les entérobactéries, la protéine FliD polymérise en un pentamère qui assemble la flagelline en filament (Maki-Yonekura *et al.*, 2003). L'absence de FliD servant à assembler la flagelline pourrait être remplacée par la présence de la gaine chez *Brucella*. Celle-ci formerait un environnement restreint qui permettrait une auto-polymérisation de la flagelline en filament. Bien que *fliD* soit présent chez *Vibrio parahaemolyticus*, la gaine pourrait être impliquée dans la polymérisation de la flagelline en filament en retenant les monomères de flagelline dans un espace restreint (McCarter, 1995) (McCarter, 2001).

Nous pouvons aussi imaginer que la production du flagelle de *Brucella* se fasse dans un environnement défavorable pour la formation du filament. Puisque la gaine recouvre le

filament, elle est en contact direct avec l'environnement. Dans ce cas, la gaine servirait de barrière et protégerait l'intégrité du filament. Chez la bactérie *Helicobacter pylori*, la flagelline du filament est sensible à l'acidité du milieu et la gaine pourrait avoir un rôle de protection contre le suc gastrique acide (Geis *et al.*, 1993).

Puisque *Brucella* ne possède qu'une seule flagelline, il est possible que la gaine protège la flagelline et empêche la reconnaissance de la flagelline par le système immunitaire. Chez *Helicobacter pylori*, il est envisagé que la gaine ait un rôle pour masquer l'activité antigénique de la flagelline (O'Toole *et al.*, 2000).

Il n'est pas exclu également que la gaine apporte une fonction d'adhérence à *Brucella*. L'analyse du génome de *Brucella* montre que certains gènes codant pour des adhésines potentielles se trouvent à proximité des gènes flagellaires. C'est le cas des gènes *BMEII1069* et *BMEII1070* codant pour une adhésine AIDA-I ou les gènes *BMEII0148* et *BMEII0149* codant pour un auto-transporteur contenant une homologie de séquence avec des hémagglutinines (Figure 61). Ces adhésines pourraient être liées au flagelle et faire partie de la composition de la gaine.

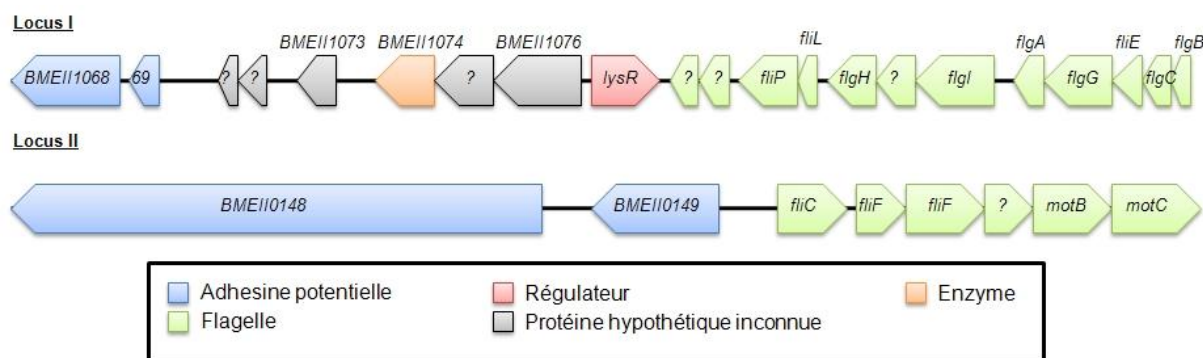


Figure 61 : Organisation génomique des adhésines potentielles à proximité des loci flagellaires de *Brucella melitensis*. Le cadre du dessous indique le code couleur des différents gènes.

Chez *H. pylori*, bien qu'aucune adhérence n'ait pu être démontrée, une adhésine HpaA a été détectée dans la gaine (Jones *et al.*, 1997). De plus, l'expression du gène *flaA* (flagelline) est liée à l'expression de *hpaA* au cours du temps (Thompson *et al.*, 2003).

Chez *E. coli*, l'adhésine EtpA se lie à la flagelline et est exposée au bout du flagelle (Roy *et al.*, 2009). Cette adhésine permet à la bactérie de s'attacher aux cellules de l'hôte. La protéine FliD empêche la liaison d'EtpA à la flagelline. On pourrait donc aussi supposer que chez *Brucella*, l'absence de FliD faciliterait l'exposition d'une adhésine sur le flagelle.

1.3. Rôle de la mobilité

Le rôle principal du flagelle chez les bactéries est bien sûr la mobilité (Moens and Vanderleyden, 1996) (Bardy *et al.*, 2003). Le flagelle de *Brucella* pourrait donc lui permettre de se déplacer.

Pourtant, l'analyse du génome n'a mis en évidence aucun système de chimiotactisme, ce qui suppose donc que si *Brucella* est mobile, elle n'est pas capable de se diriger. Le séquençage de deux Archaeobactéries a également montré la présence de gènes flagellaires, mais l'absence de gènes codant un système de chimiotactisme (Wadhams and Armitage, 2004) (Faguy and Jarrell, 1999). L'absence d'un système de chimiotactisme n'est pas synonyme d'immobilité puisque *Legionella pneumophila* est également dépourvue de ce système mais est néanmoins mobile (Heuner and Steinert, 2003).

Bien que nous ayons mis en évidence la présence d'un flagelle, nous n'avons pas pu observer des *Brucellae* mobiles en milieu liquide riche ou sur des milieux mous contenant différentes concentrations d'agar allant de 0.15 à 0.4% (aussi appelé milieu de mobilité).

Néanmoins, nous n'avons testé qu'un milieu de culture classique riche dans lequel *Brucella* croît facilement, et un milieu mou minimum (voir matériel et méthode). Il existe une multitude d'autres conditions qui pourraient être nécessaires au mouvement de *Brucella*. Il est donc probable que *Brucella* soit mobile mais uniquement dans certaines conditions physico-chimiques particulières.

Par exemple, la bactérie *Geobacter metallireducens* fut décrite en 1993 comme non-mobile. Cependant, en 2002, Childers *et al.* démontrèrent que *G. metallireducens* est mobile en présence d'un milieu de culture contenant du Fer(III) insoluble (Childers *et al.*, 2002). D'autres bactéries ont longtemps été considérées comme non mobiles alors que le séquençage récent de leur génome révèle la présence d'un système flagellaire. C'est le cas d'*Acidothermus cellulolyticus* 11B, dont la mobilité va être ré-examinée suite à la découverte d'un système flagellaire (Barabote *et al.*, 2009).

Brucella est une bactérie intracellulaire facultative et nous ne savons que très peu de choses sur les conditions environnementales qu'elle rencontre *in vivo*. Les conditions de culture de laboratoire *in vitro* sont très différentes des conditions rencontrées *in vivo* dans l'écosystème naturel de la bactérie (Fux *et al.*, 2005).

Il est aussi envisageable que notre souche de laboratoire ait perdu la capacité de se déplacer. Notons par exemple qu'après 60 à 90 générations d'une souche d'*E. coli*, on retrouve environ 40 gènes inactivés dont 17 dans des opérons requis pour la production du flagelle (Edwards *et al.*, 2002). Il semblerait donc que le système flagellaire ne soit pas indispensable à la bactérie dans les conditions de laboratoire, et subisse plus facilement des mutations.

1.4. D'autres rôles potentiels du flagelle chez *Brucella*

Le flagelle de *Brucella* pourrait avoir évolué et acquis une fonction supplémentaire ou différente de la mobilité. En effet, ces dernières années une multitude de fonctions supplémentaires du flagelle ont été découvertes chez les autres bactéries.

Par exemple, bien que la bactérie endosymbiotique *Buchnera aphidicola* soit non mobile, elle produit des centaines de structures basales en membrane (Maezawa *et al.*, 2006). Cette bactérie possède tous les gènes pour produire un corps basal et un coude, mais pas la partie distale comme le filament. Il est probable que cette bactérie utilise la structure flagellaire pour la sécrétion de protéines nécessaires à son endosymbiose (Snyder *et al.*, 2009).

D'autres espèces mobiles, comme *Yersinia enterocolitica* et *Campylobacter jejuni*, utilisent aussi leur système de sécrétion flagellaire pour sécréter des protéines de virulence (Young *et al.*, 1999) (Konkel *et al.*, 2004) (Poly *et al.*, 2007).

La mobilité produite par le flagelle est nécessaire à l'initiation de la formation de biofilm. Cependant, il est possible que la structure qui permette la mobilité soit aussi impliquée (Yildiz and Visick, 2009). Dans le cas de *C. jejuni*, le flagelle est aussi impliqué dans le phénomène d'auto-agglutination (AAG) et la formation de biofilm (Guerry, 2007). Le flagelle intervient également dans la formation de biofilm chez *Pyrococcus furiosus*, *Y. enterocolitica* ou chez différentes espèces d'*Aeromonas* (Nather *et al.*, 2006) (Kim *et al.*, 2008) (Kirov, 2003).

De plus, le flagelle a également un rôle de « senseur » de l'environnement (McCarter, 2001). Par exemple, lorsque le flagelle polaire de *Vibrio parahaemolyticus* est ralenti par une condition extérieure (par exemple une augmentation de la viscosité du milieu), son deuxième système flagellaire latéral est activé. Par un mécanisme différent impliquant FlgM, *S. typhimurium* est également capable de sentir l'humidité du milieu grâce son flagelle (Wang *et al.*, 2005).

A partir de tout ces exemples, il n'est pas exclu que *Brucella* utilise également son système flagellaire à d'autres fins que la mobilité. Quoiqu'il en soit, et indépendamment de la structure flagellaire, les gènes flagellaires sont nécessaires lors de l'infection de l'hôte et démontre un rôle du flagelle dans la virulence (Fretin *et al.*, 2005) (Zygmunt *et al.*, 2006).

2. Analyse de la flagelline de *Brucella*

Après avoir discuté de la structure du flagelle de *Brucella* et débattu des différents rôles potentiels du flagelle, nous nous sommes intéressés au filament, et particulièrement à la protéine qui le compose : la flagelline ou FliC.

En comparaison avec certaines autres α -protéobactéries qui possèdent plusieurs flagellines, comme par exemple *C. crescentus*, *S. meliloti* ou *A. tumefaciens*, *Brucella* ne possède qu'une seule flagelline (Ely *et al.*, 2000) (Scharf *et al.*, 2001) (Deakin *et al.*, 1997) (Fretin *et al.*, 2005).

Le gène *fliC* codant la flagelline est le premier gène du premier locus et ne semble pas en opéron avec le reste des gènes flagellaires en aval (Fretin *et al.*, 2005). L'analyse du promoteur de *fliC* laisse supposer que sa transcription est dépendante des régulateurs CtrA et VjbR (Hallez *et al.*, 2004) (de Jong *et al.*, 2008).

2.1. Construction de mutants ne produisant plus de flagelline

Nous avons tout d'abord muté le gène *fliC* et testé la virulence de ce mutant comparé à une souche sauvage de *B. melitensis*.

Nous avons montré au laboratoire que les gènes situés dans les 3 loci flagellaires étaient nécessaires à la virulence de *Brucella* lors d'infections murines (Fretin *et al.*, 2005) (Leonard *et al.*, 2007). Ces mutants ont été construits par insertion d'un plasmide intégratif dans les gènes cibles (Fretin *et al.*, 2005).

Après 4 semaines d'infection en souris, les mutants flagellaires sont tous atténués par rapport à une souche sauvage. Cependant, un effet polaire sur les autres gènes en aval du gène muté reste probable. Pour éviter cet inconvénient, nous avons reconstruit des mutants flagellaires en utilisant une autre technique de mutation qui évite cet effet polaire (Menard *et al.*, 1993).

Parmi les nouveaux mutants construits, nous avons étudié le rôle de la flagelline grâce au mutant *fliC*. Nous avons recommencé les infections de souris avec ce mutant comparé à la souche sauvage de *B. melitensis*. Contrairement aux résultats obtenus avec l'ancien mutant *fliC* intégratif, le nouveau mutant *fliC* est plus virulent que la souche sauvage après 4 semaines d'infection.

2.2. L'absence de flagelline exacerbe la virulence de *Brucella* en souris

La signification des résultats obtenus est difficilement interprétable, néanmoins nous pouvons observer un effet spécifique de la flagelline sur la virulence de *Brucella*.

En effet, le gène *fliC* se trouve juste en amont de l'opéron flagellaire de *fliF*, et la mutation dans l'ancien mutant intégratif *fliC* a sans doute perturbé le reste de l'opéron *fliF*, ce qui expliquerait que l'ancien mutant *fliC* possédait le même phénotype que le mutant *fliF*. De plus, nous avons également construit un nouveau mutant apolaire *fliF*, et celui-ci possède le même phénotype que le mutant *fliF* intégratif, c'est-à-dire une diminution de la virulence en souris après 4 semaines d'infection.

Parmi les gènes flagellaires étudiés, nous avons également muté un gène impliqué dans la régulation spécifique de la flagelline, le gène *flbT*. De façon intéressante, le mutant *flbT* présente le même phénotype que le mutant *fliC* apolaire, c'est-à-dire une virulence exacerbée. La mutation de *flbT* entraîne une absence de production de flagelline. Cette régulation est spécifique puisque il n'y a pas de différence entre la production de FlgE dans la souche sauvage et dans le mutant *flbT*.

Nous pouvons conclure de ces résultats que FlbT régule spécifiquement la flagelline et que le phénotype de virulence exacerbée du mutant *flbT* et du mutant *fliC* est associé à une absence de flagelline.

Un cas similaire de virulence exacerbée en modèle murin a été décrit avec un mutant de *Salmonella* ne produisant plus de flagelline (Vijay-Kumar *et al.*, 2006). Dans cette expérience, l'inflammation exacerbée des muqueuses intestinales et le nombre de bactéries diminue lors de l'adjonction de flagelline.

Un autre exemple est également décrit lors d'infection de plante *Arabidopsis* avec une souche de *Pseudomonas*. Une plante inoculée avec un mutant *fliC* de *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* présente une infection sévère liée à une croissance importante des bactéries dans les feuilles. Par contre, cette infection est inapparente lors d'une inoculation avec une souche sauvage, et le nombre de bactéries dans les feuilles est 10 fois moins important (Li *et al.*, 2005).

Il est possible que la flagelline stimule le système immunitaire et provoque une réaction de l'hôte qui tend à éliminer rapidement les bactéries parasites. En absence de flagelline, le système d'alarme de l'hôte reconnaissant la flagelline n'est pas enclenché et la bactérie prolifère plus rapidement en absence de réaction de l'hôte.

Nos résultats montrent aussi que contrairement au mutant *fliC*, les autres mutants flagellaires sont atténués en souris. Cependant, la flagelline est toujours produite dans ces mutants. Il est probable que même en absence d'un système de sécrétion flagellaire fonctionnel, la flagelline soit sécrétée par le système de sécrétion de type IV (voir point 5).

Notons qu'il a récemment été démontré que chez *L. pneumophila*, *S. typhimurium* et *P. aeruginosa*, la flagelline peut être sécrétée par le système de sécrétion de type III ou IV (Miao *et al.*, 2006) (Miao *et al.*, 2007) (Miao *et al.*, 2008) (Franchi *et al.*, 2006) (Sun *et al.*, 2007) (Sutterwala and Flavell, 2009). Dans ce cas, la flagelline serait tout de même sécrétée dans tous les autres mutants flagellaires et activerait le système immunitaire de l'hôte.

Le cas du mutant intégratif *fliC* (qui aurait peut être un effet polaire sur *fliF* en aval) montre néanmoins une atténuation similaire aux autres mutants flagellaires (Fretin *et al.*, 2005). Dans ce contexte, on peut supposer que la structure flagellaire elle-même soit importante à l'infection ou que le système flagellaire soit utile à la sécrétion d'autres facteurs de virulence inconnus.

Une structure flagellaire minimum est nécessaire à la sécrétion de protéines. Par exemple, un mutant *flgE* ou *flgF* de *C. jejuni* ne sécrète plus les protéines dans le milieu (Song *et al.*, 2004) (Poly *et al.*, 2007). L'absence d'une structure flagellaire diminuerait donc la virulence de *Brucella* (Figure 62).

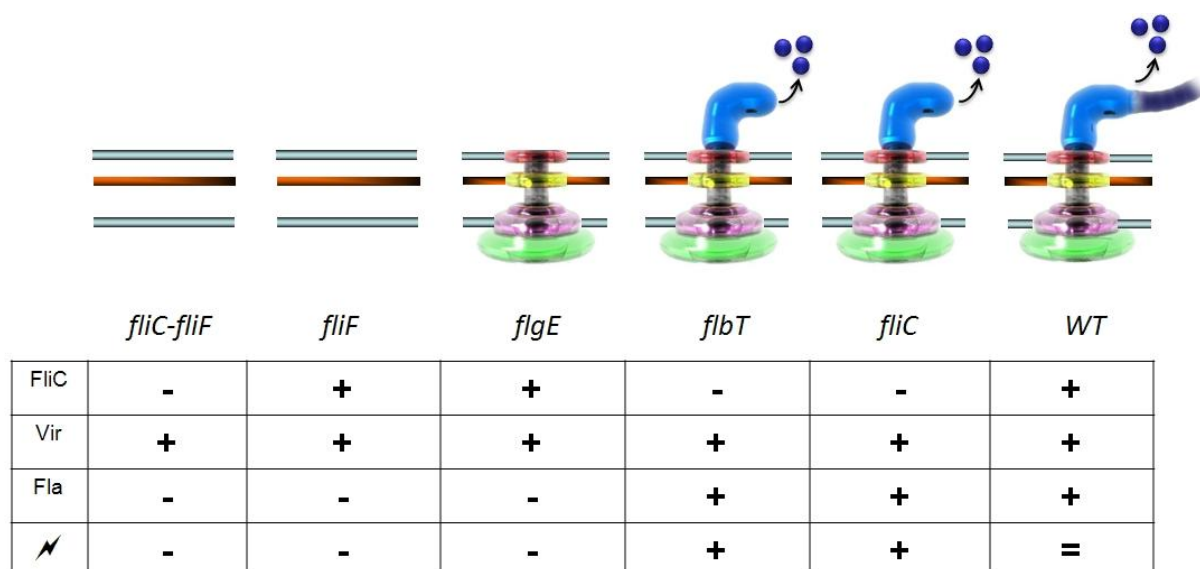


Figure 62 : Modèle de la virulence des mutants flagellaires. La structure flagellaire produite par un mutant est représentée au-dessus. La flèche et les boules bleues représentent la sécrétion de protéines. FliC, flagelline ; Vir, facteur de virulence potentiel ; Fla, présence d'une structure flagellaire fonctionnelle; ⚡, virulence en souris. *fliC-fliF*, mutant *fliC* intégratif (Fretin *et al.*, 2005); *fliF*, mutant *fliF*; *flgE*, mutant *flgE*; *flbT*, mutant *flbT*; *fliC*, mutant *fliC*; WT, souche sauvage de *B. melitensis*. (-) absence ou diminution; (+) présence ou augmentation; (=) virulence d'une souche sauvage.

Chez certaines bactéries, la production de flagelline est néfaste pour leur virulence (Akerley *et al.*, 1995) (Niedergang and Kweon, 2005). Par exemple, chez *Listeria monocytogenes*, la surproduction de flagelline FlaA par un mutant *mogR* diminue la virulence de la bactérie de 250 fois (Grundling *et al.*, 2004) (Shen and Higgins, 2006). La surproduction de la flagelline est également délétaire pour la réplication de *Salmonella in vivo* (Salazar-Gonzalez *et al.*, 2007).

Il est donc plausible que la flagelline de *Brucella* soit également néfaste à un moment de l'infection. Néanmoins, notons que nous n'avons testé que le modèle murin pour les expériences d'infection. Il pourrait être intéressant de tester d'autres modèles d'infection ou de suivre la croissance du mutant *fliC* et/ou *flbT* lors de l'infection murine par la technique d'« *in vivo* bioluminescent imaging » (Rambow-Larsen *et al.*, 2008).

2.3. Reconnaissance de la flagelline par les cellules eucaryotes

Au niveau cellulaire, les cellules eucaryotes ont développé un système de reconnaissance extracellulaire et intracellulaire de la flagelline (voir introduction point 6).

Pour détecter la présence de pathogènes dans l'organisme, le système immunitaire inné utilise certains récepteurs spécifiques nommés PRRs (Pattern-Recognition Receptors). Ces récepteurs déclenchent l'inflammation lorsqu'ils reconnaissent des structures conservées chez les pathogènes (nommés PAMP pour « Pathogen-Associated Molecular Patterns »).

Les TLRs (Toll-Like Receptor) sont des récepteurs membranaires qui font partie de ces PRRs (Akira and Takeda, 2004) (voir introduction point 6).

Chez les plantes, la flagelline de *Pseudomonas syringae* est capable d'activer le système immunitaire inné (Li *et al.*, 2005). En effet, la flagelline se fixe aux récepteurs FLS2 (flagellin sensitive receptor) des cellules des plantes et active la cascade de phosphorylation MAPK qui déclenche la production de protéines de défense (Gomez-Gomez and Boller, 2002) (Asai *et al.*, 2002). En absence de flagelline, ce système n'est pas activé, et la plante devient plus sensible à l'infection bactérienne.

Un système homologue est présent chez les cellules animales. La flagelline des bactéries pathogènes est reconnue par les récepteurs TLR5 des cellules animales (Hayashi *et al.*, 2001). Il fut proposé que la flagelline de *Brucella* pourrait être reconnue par les TLR5 et activer à son tour le système immunitaire de l'hôte (Fretin *et al.*, 2005).

Comme pour *P. syringae*, l'absence de production de flagelline permettrait à *Brucella* de ne pas activer le système immunitaire inné de l'hôte et de proliférer plus facilement. Un mutant de *Brucella* ne produisant plus de flagelline agirait alors comme un cheval de Troie dans la cellule.

Cependant, les données actuelles tendent plutôt vers une non-reconnaissance de la flagelline de *Brucella* par les TLR5 (Andersen-Nissen *et al.*, 2005). Certaines α et ϵ -protéobactéries ont modifié leur flagelline pour que le TLR5 ne la reconnaisse plus (Figure 63).

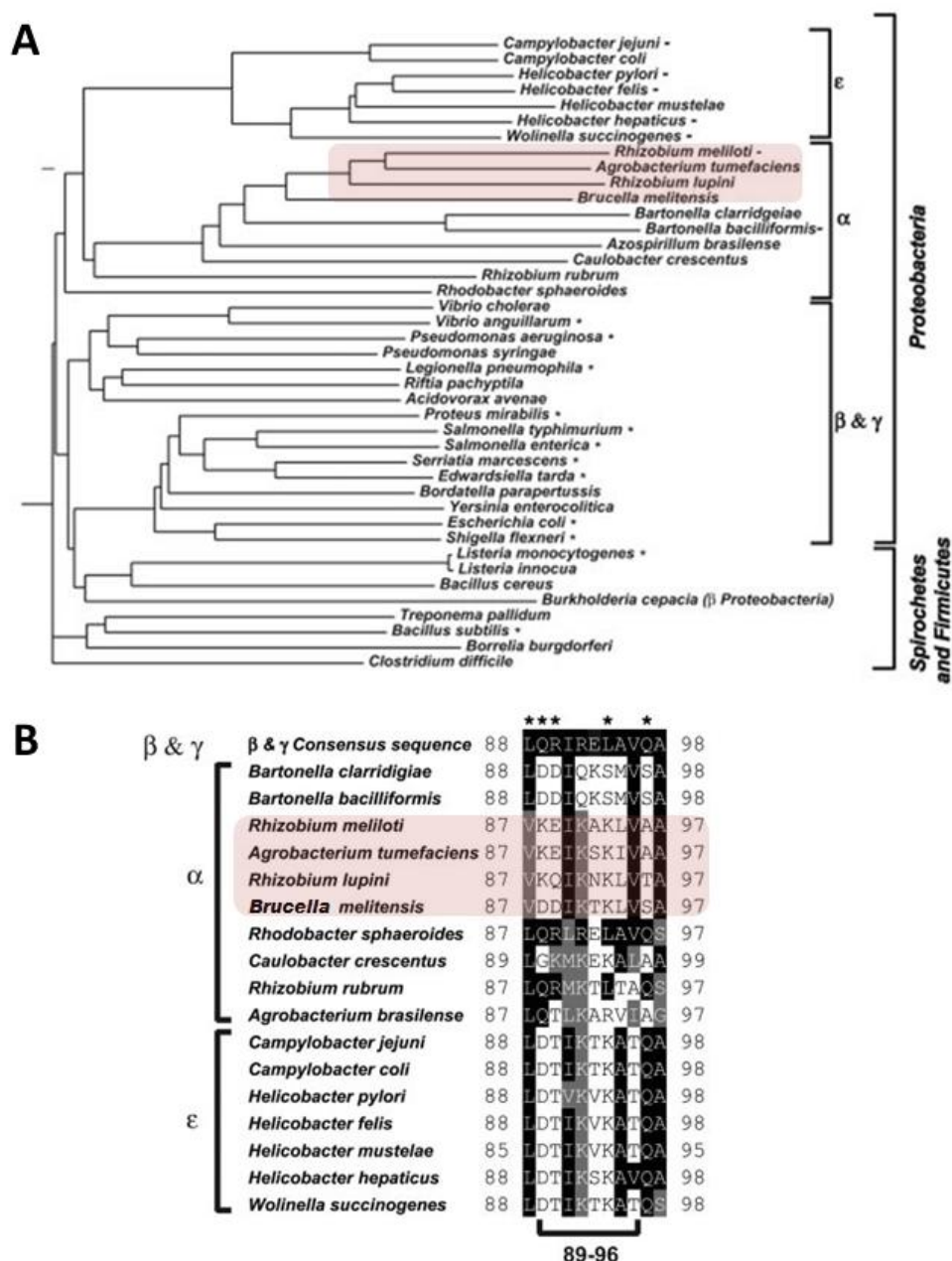


Figure 63 : Tableau et comparaison des flagellines. (A) Arbre moléculaire des différentes séquences de flagellines. (-) Bactéries testées qui n'active pas le TLR5; (*) bactérie testées qui active le TLR5. (B) Alignement de séquences de la flagelline de *Brucella* par rapport aux α et ε-protéobactéries. Les astérisques indiquent les résidus importants pour la reconnaissance par le TLR5. Les rhizobiales sont en rouge (Andersen-Nissen *et al.*, 2005).

L'analyse de la séquence de la flagelline de *Brucella* montre que les résidus nécessaires à la reconnaissance de la flagelline ne sont pas conservés (Figure 63B). De plus, des données expérimentales montrent que la sécrétion de la flagelline de *B. abortus* n'active pas la voie des TLR5 (communication personnelle de (Tsolis, 2008)).

Néanmoins, un autre système de reconnaissance de la flagelline a été découvert récemment (Ren *et al.*, 2006). La flagelline intracellulaire est aussi détectée dans le cytosol des cellules par des récepteurs cytoplasmique comme Ipaf ou Naip5 (voir introduction point

6). La flagelline de *L. pneumophila* est injectée dans le cytosol du macrophage, puis est reconnue par la protéine Ipaf qui active le système immunitaire inné du macrophage (Sun *et al.*, 2007) (Miao *et al.*, 2007).

En infectant des macrophages THP-1 avec un mutant de la flagelline FlaA de *Legionella* comparé à une souche sauvage, on observe également une virulence exacerbée du mutant *flaA* (Vinzing *et al.*, 2008). Tout comme *Legionella*, *Brucella* est une bactérie intracellulaire facultative. Bien que ces deux espèces ne soient pas génétiquement proches, elles partagent certaines homologues, comme l'absence d'un système de chimiotactisme et la présence d'un système de sécrétion de type IV.

Comme *Legionella*, il est envisageable que la flagelline de *Brucella* soit injectée dans le cytosol lors de l'infection du macrophage. De plus, le flagelle est probablement exprimé en cellule puisque le promoteur de *fliF* est actif lors d'une infection de cellules (Fretin *et al.*, 2005). La flagelline de *Brucella* pourrait être reconnue par Ipaf en intracellulaire et activer le système immunitaire inné de l'hôte.

Chez *Legionella* il est également possible que le système de sécrétion de type IV soit à l'origine de la sécrétion de flagelline dans le cytosol du macrophage (Sutterwala and Flavell, 2009). Chez *Brucella*, la régulation du système de sécrétion de type IV et le flagelle sont liés par un régulateur commun nommé VjbR (Delrue *et al.*, 2005).

Pour terminer, une étude utilisant des vaccins à ADN a également montré un effet particulier de la flagelline de *Brucella* (Commander *et al.*, 2007). Dans cette étude, la flagelline est produite par la souris grâce à une vaccination à ADN nu, ce qui équivaut à une transfection d'un plasmide *in vivo*.

Les souris infectées ayant reçu le vaccin à ADN montrent une augmentation significative du nombre de *Brucella* dans la rate. Les auteurs concluent que de manière surprenante l'utilisation de FliC comme vaccin à ADN exacerbe l'infection de *Brucella*. Bien que ce résultat soit difficilement explicable, il montre néanmoins que la flagelline de *Brucella* a une action spécifique sur le système immunitaire de l'hôte.

La conclusion de cette analyse montre que la reconnaissance et l'action de la flagelline par l'hôte infecté est un champ d'investigation qui permettrait de mieux comprendre la virulence de *Brucella*.

3. Régulation de l'expression des gènes flagellaires

Durant la deuxième partie de cette thèse, nous avons également abordé la régulation du flagelle et proposé un modèle de régulation flagellaire chez *Brucella*. Ce modèle est élaboré à partir des données expérimentales obtenues dans ce travail et des données bibliographiques disponibles sur la régulation du flagelle, principalement chez les Rhizobiales.

Nous pouvons imaginer le système flagellaire en plusieurs composantes (Figure 64). Tout d'abord, un signal déclencheur provoque l'activation (ou la répression) du flagelle comme un interrupteur.

Suite à cette activation, le flagelle est assemblé par une cascade d'activation de gènes flagellaires. L'expression des gènes flagellaires peut être contrôlée à l'intérieur de cette cascade. Pour terminer, l'expression du flagelle est stoppée puis sa destruction ou son éjection est activée (Figure 64).

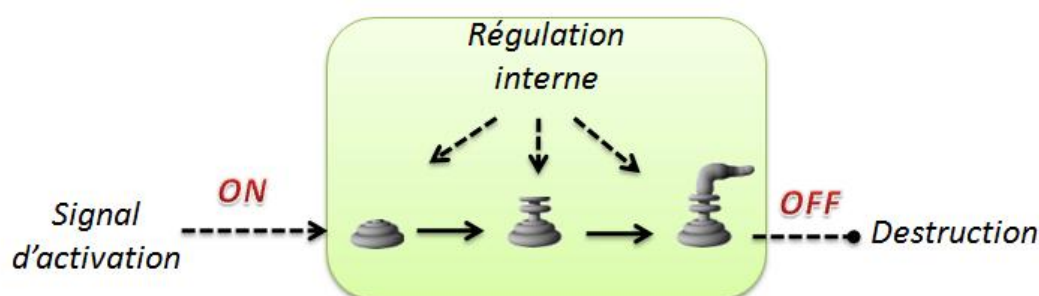


Figure 64 : Schéma d'activation et de régulation du système flagellaire. Un signal d'activation enclenche la production du flagelle (ON). Ce signal peut être de type environnemental ou intracellulaire. Le cadre vert représente la partie soumise à une régulation interne à l'assemblage du flagelle. Pour terminer, des régulateurs interviennent dans la disparition du flagelle (OFF). Flèches pleines, assemblage du flagelle; flèches pointillées, régulation.

Nous allons d'abord développer ici quelques **signaux** qui pourraient contrôler l'activation ou la répression du flagelle chez *Brucella*, puis dans le point suivant, nous nous attarderons sur les **régulateurs** impliqués.

3.1. Signaux de régulation des gènes flagellaires chez *Brucella*

Le signal peut être environnemental de type physico-chimique tel que la température ou la composition du milieu. Par exemple, dans des conditions de limitation en oxygène, l'expression des gènes flagellaires est activée chez *E. coli* (Landini and Zehnder, 2002). La limitation de carbone dans l'environnement est aussi un signal pour l'activation du flagelle chez *E. coli* (Zhao *et al.*, 2007). Notons également que la température et le pH jouent aussi un rôle sur la biosynthèse du flagelle chez *S. enteritidis* (Walker *et al.*, 1999).

Le signal peut également être interne à la bactérie, et par exemple, être lié au cycle cellulaire comme chez *C. crescentus* (Wu and Newton, 1997).

3.1.1. Composition du milieu

Dans le cas de *Brucella*, nous ne connaissons encore que peu de choses sur les facteurs activant la production du flagelle. *Brucella* est une bactérie intracellulaire facultative qui se réplique dans les macrophages (Celli, 2006).

Lors de sa réplication en macrophage, elle rencontre une série de conditions de stress comme l'acidification du pH (Kohler *et al.*, 2002b) (Kohler *et al.*, 2002a). Ces conditions de stress pourraient également jouer sur la régulation du flagelle. C'est le cas de la bactérie intracellulaire *L. pneumophila* qui exprime son flagelle en macrophage à la fin de l'infection, au moment où la cellule est remplie de bactéries (Heuner and Steinert, 2003).

Chez *R. meliloti*, la mobilité et l'expression des flagelles sont aussi contrôlés par le milieu (Wei and Bauer, 1998). De plus, le pH agit sur l'expression des gènes flagellaires de *S. meliloti* (Hellweg *et al.*, 2009).

Chez *Brucella*, la croissance en milieu pauvre en nutriments augmente l'expression du flagelle (Léonard, 2005). Cet environnement pourrait se retrouver dans la niche de réplication lors de son infection en cellule (Kohler *et al.*, 2002b) (Kohler *et al.*, 2002a) (Roop *et al.*, 2004). Notons également que le promoteur du gène *fliF* de *Brucella* est actif lors d'une infection de cellule (Fretin *et al.*, 2005). Un environnement stressant pauvre en nutriments pourrait donc être un activateur du flagelle de *Brucella*.

3.1.2. La lumière

La lumière pourrait également jouer un rôle sur le flagelle. Par exemple, la lumière verte permet d'activer la rotation du flagelle d'*E. coli* (Walter *et al.*, 2007).

Il a récemment été démontré que la lumière influençait la virulence de *Brucella*. En effet, la lumière bleue agit sur le système photorécepteur LOV composé d'histidine kinases (Swartz *et al.*, 2007) (Kennis and Crosson, 2007). Chez *A. tumefaciens*, la lumière a un effet répresseur sur la mobilité (Oberpichler *et al.*, 2008), et ce phénomène est également décrit chez d'autres rhizobiales.

Les signaux environnementaux physico-chimiques sont perçus par la bactérie via des protéines bactériennes qui ont un rôle de senseur de l'état général du milieu, c'est par exemple le cas des systèmes à deux composantes utilisant les histidine kinases (Mascher *et al.*, 2006). Une fois le signal externe perçu, différents régulateurs à la base de l'expression du flagelle vont être activés ou réprimés.

3.1.3. Le cycle cellulaire

Comme chez *C. crescentus*, l'activation du flagelle pourrait dépendre du cycle cellulaire chez *Brucella*. CtrA est un régulateur du cycle cellulaire et le régulateur maître des gènes flagellaires chez *C. crescentus* (McAdams *et al.*, 2004). D'autres α -protéobactéries possèdent un homologue de CtrA, comme *S. meliloti*, *A. tumefaciens* mais aussi *B. abortus* (Hallez *et al.*, 2004). L'implication de CtrA de *Brucella* est discutée dans le point 3.2.5.

3.1.4. La population bactérienne

La densité de population bactérienne est également un signal pour l'activation ou la répression du flagelle (Daniels *et al.*, 2004). Les bactéries produisent des molécules signal dans l'environnement aussi appelées AHL (voir point 4).

Plusieurs modèles existent pour expliquer le lien entre la population bactérienne et la régulation génique (Hense *et al.*, 2007). Des régulateurs homologues aux régulateurs permettant de sentir la densité de population sont décrits chez *Brucella* et sont liés à l'expression des gènes flagellaires (Delrue *et al.*, 2005) (Rambow-Larsen *et al.*, 2008). L'implication de ces régulateurs est discutée dans les points 3.2.2 et 3.2.3 et le rôle de la densité de population dans le point 4.

3.2. Implication de différents régulateurs dans le contrôle du flagelle de *Brucella*

Une fois les signaux perçus par la bactérie, des régulateurs vont enclencher la transcription des gènes flagellaires, et à terme, la production du flagelle. Voici un bref aperçu des régulateurs pouvant être impliqués dans la régulation interne du flagelle de *Brucella*. Leur implication sera décrite à partir des données *in vitro* ou *in silico* obtenues lors de ce travail et à partir des données bibliographiques.

3.2.1. Le régulateur maître : FtcR

Chez *Brucella*, l'expression des gènes flagellaires est déclenchée par le régulateur FtcR (Leonard *et al.*, 2007). Celui-ci est considéré comme le régulateur maître de classe I à l'origine de l'expression des gènes flagellaires chez les Rhizobiales. De plus, l'homologue Rem possède la même fonction chez *S. meliloti* (Rotter *et al.*, 2006).

FtcR se fixe au moins sur le promoteur de *fliF*, qui est en général la première pièce flagellaire à être produite (Leonard *et al.*, 2007) (Rotter *et al.*, 2006). Par homologie avec les résultats expérimentaux de footprint obtenus chez *S. meliloti* et nos données *in silico*, nous pouvons également supposer une liaison directe de FtcR aux promoteurs de *flgB*, *flhA*, BMEII0153 et une auto-activation de *ftcR* (Rotter *et al.*, 2006).

3.2.2. Implication d'un régulateur du Quorum Sensing : VjbR

Le régulateur transcriptionnel VjbR a également été décrit comme activateur du flagelle de *Brucella* (Delrue *et al.*, 2005). La mutation de ce régulateur engendre une diminution de l'activité du promoteur de *fliF* (Leonard *et al.*, 2007).

VjbR agit sur les gènes flagellaires en contrôlant l'expression de *ftcR*. En effet, l'activité du promoteur de *ftcR* est diminuée de moitié dans un mutant *vjbR* comparé à une souche sauvage, ce qui laisse supposer que VjbR régule une partie de la transcription de *ftcR* et se retrouverait donc en amont dans une cascade de régulation flagellaire (Leonard *et al.*, 2007).

Chez *S. meliloti*, l'expression de *rem* (l'homologue de *ftcR*) est abolie dans un mutant des régulateurs VisN et VisR, ce qui montre l'action du locus *visNR* sur *rem* (Rotter *et al.*, 2006) (Bahlawane *et al.*, 2008). Or, *visN* se trouve à la même position génomique que *vjbR* et est aussi un régulateur de type LuxR (Sourjik *et al.*, 2000). Le fait que VjbR soit également un régulateur du système de sécrétion de type IV laisse entrevoir un lien entre le flagelle et le système de sécrétion de type IV (Voir point 5).

3.2.3. Implication d'un autre régulateur de type LuxR : BlxR

Notons que récemment, le régulateur BlxR de type LuxR a été découvert et contrôlerait l'activation du flagelle de *Brucella* (Rambow-Larsen *et al.*, 2008). En plus de jouer une action sur les gènes *virB* du système de sécrétion de type IV et sur le flagelle, BlxR s'auto-active et contrôle l'activation de VjbR. Cette auto-activation est aussi décrite pour VjbR (Rambow-Larsen *et al.*, 2008).

3.2.4. Implication d'un régulateur d'exopolysaccharides : MucR

Chez *S. meliloti*, MucR est une protéine « zinc finger » qui contrôle la production d'exopolysaccharides (EPS) (Bertram-Drogatz *et al.*, 1998). MucR active la production de succinoglycane et inhibe la synthèse de galactoglucane. Il inhibe aussi la production du flagelle de *S. meliloti* en se fixant sur le promoteur de *rem* (Bahlawane *et al.*, 2008).

Le facteur transcriptionnel Ros d'*A. tumefaciens* partage 80% d'identité avec MucR et contrôle différents gènes de virulence (Chou *et al.*, 1998). Ce régulateur est donc conservé chez les Rhizobiales.

L'ORF BMEI1364 de *Brucella* possède 72% d'identité avec *mucR*. De plus, le site de liaison de MucR dans le promoteur de *ftcR* semble conservé, ce qui laisse entrevoir un rôle similaire chez *Brucella* (Figure 65).

La formation de biofilm par *Brucella* (Uzureau *et al.*, 2007) suggère peut être un lien entre le système flagellaire et la formation de biofilm via MucR.

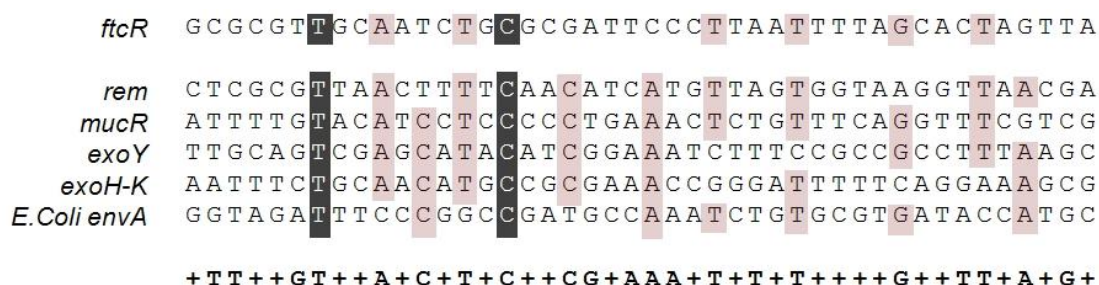


Figure 65 : Alignement du promoteur de *ftcR* avec les promoteurs des gènes contenant un site de liaison à MucR décrit par Bahlawane *et al* (Bahlawane *et al.*, 2008). En rouge, base conservée dans au moins 66% des séquences présentées. En noir, base conservée dans 100% de séquences présentées. En dessous en gras, séquence consensus décrite par Bahlawane *et al* (Bahlawane *et al.*, 2008).

3.2.5. Implication d'un régulateur du cycle cellulaire : CtrA

CtrA est un régulateur du cycle cellulaire et le régulateur maître des gènes flagellaires chez *C. crescentus* (McAdams *et al.*, 2004). Il est aussi responsable de la division asymétrique chez *C. crescentus*. *B. abortus* possède aussi un homologue de CtrA (Hallez *et al.*, 2004). Chez *B. abortus*, CtrA contrôle également le cycle cellulaire mais via des gènes cibles différents (Bellefontaine *et al.*, 2002).

L'analyse *in silico* des promoteurs flagellaires de *Brucella* suggère que l'homologue du régulateur du cycle cellulaire CtrA puisse également être un candidat potentiel dans l'activation de l'expression du flagelle (Hallez *et al.*, 2004). CtrA pourrait réguler l'expression du flagelle en activant FtcR puisque l'on retrouve un motif de liaison à l'ADN de CtrA dans le promoteur de *ftcR*.

3.2.6. Implication d'un régulateur structural de l'ADN : IHF

IHF (Integration Host Factor) est une petite protéine ressemblant à une histone qui est très répandue chez les bactéries à Gram négatif (Goodman *et al.*, 1999) (Brassinga *et al.*, 2002). Chez *E. coli*, IHF intervient dans la réplication en se fixant sur l'origine de réplication (*oriC*) et en produisant un changement de structure de l'ADN (Rice *et al.*, 1996).

L'analyse des promoteurs flagellaires montre que FtcR pourrait être contrôlé par IHF. En se liant au promoteur de *ftcR*, IHF pourrait changer la structure secondaire du promoteur et perturber la régulation ou l'activation de FtcR.

Dans des souches de *E. coli* entéro-pathogènes (EPEC) et entéro-hémorragiques (EHEC), IHF réprime l'expression des gènes flagellaires en agissant sur les gènes maîtres *flhD* et *flhC* (Yona-Nadler *et al.*, 2003). Les gènes flagellaires sont également régulés par IHF chez *C. crescentus* (Muir and Gober, 2005).

Chez *Brucella*, IHF régule l'expression du système de sécrétion de type IV en se liant au promoteur de *virB* et en changeant sa conformation (Sieira *et al.*, 2004). Comme pour VjbR, IHF pourrait à la fois réguler les gènes *virB* et les gènes flagellaires.

3.2.7. Implication d'un facteur sigma extracytoplasmique : RpoE1

Les facteurs sigma extracytoplasmiques (ECF) interviennent dans l'intégrité de la paroi bactérienne (Raivio and Silhavy, 2001). Ils contrôlent les gènes impliqués dans le reploiement des protéines dénaturées ou la dégradation des protéines endommagées dans le périplasme et en membranes.

Brucella possède deux facteurs sigma ECF nommés RpoE1 et RpoE2 (Delory *et al.*, 2006). La mutation de *rpoE1* de *Brucella* (BMEI0371) provoque une augmentation de l'activité du promoteur de *fliF*, ce qui semble indiquer qu'en supprimant ce facteur, on empêche l'action d'un répresseur encore inconnu sur l'activation des gènes flagellaires (Delory *et al.*, 2006).

La répression des gènes flagellaires par le facteur sigma AlgT est décrite chez *P. aeruginosa* (Garrett *et al.*, 1999). Tout comme le facteur sigma RpoE1 de *Brucella*, AlgT est un facteur sigma extracytoplasmique.

AlgT réprime les gènes flagellaires en agissant indirectement sur le régulateur flagellaire maître *fleQ* (Tart *et al.*, 2005). AlgT est inactif lorsqu'il est lié au facteur anti-sigma MucA. Mais lorsqu'AlgT est libéré, il active la transcription de AmrZ, un inhibiteur transcriptionnel du gène maître flagellaire *fleQ* (Tart *et al.*, 2006). Bien qu'aucun homologue de AmrZ ne soit présent chez *Brucella*, RpoE1 pourrait agir de façon similaire sur un inhibiteur de FtcR (Figure 66).

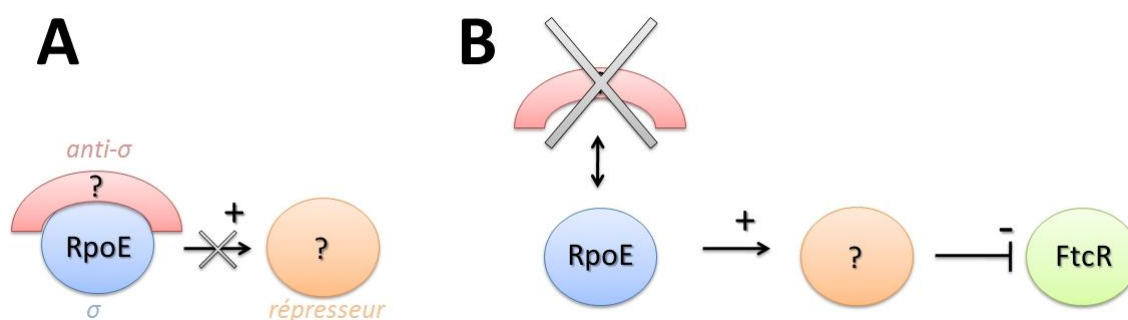


Figure 66 : (A) L'anti-sigma (rouge) est lié à RpoE1 (bleu) et empêche l'activation du répresseur des gènes flagellaires (orange). (B) RpoE1 libre active l'expression du répresseur flagellaire qui réprime les gènes flagellaires via *ftcR* (vert).

A partir du consensus décrit pour le facteur sigma RpoE chez *E. coli*, nous avons analysé le génome de *Brucella* à la recherche des gènes potentiellement régulés par RpoE1 (Rhodius *et al.*, 2006). L'analyse des promoteurs nous laisse envisager une autorégulation de RpoE1.

Parmi les 51 gènes cibles dont le promoteur contient le consensus de liaison au facteur RpoE, nous retrouvons 4 régulateurs transcriptionnels potentiels. Parmi ces 4 régulateurs, il est intéressant de noter que l'on retrouve le gène BMEI0372 codant pour un homologue du nouveau régulateur PhyR décrit chez *Methylobacterium extorquens* AM1 (Gourion *et al.*, 2008) (Gourion *et al.*, 2006). Le gène *rpoE1* est bordé par les gènes du régulateur de réponse PhyR (BMEI0372) et d'une histidine kinase senseur potentielle (BMEI0370) (Figure 67A).

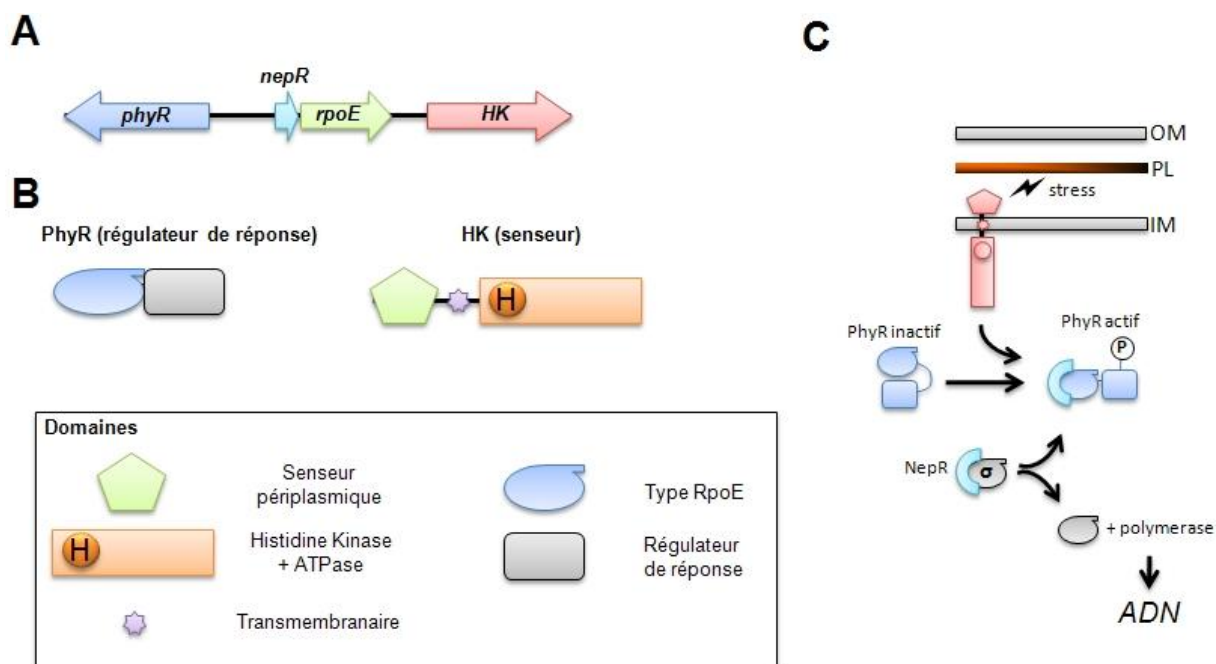


Figure 67 : Description du locus *rpoE1* de *Brucella*. (A) Le gène *rpoE1* (vert) est bordé par le gène d'une histidine kinase (HK en rouge) et le gène *phyR* du régulateur hybride (en bleu foncé). Bien qu'il ne soit pas annoté dans le génome, la séquence d'un anti-facteur sigma potentiel est présente en amont de *rpoE1* (*nepR* en bleu turquoise). (B) L'analyse des domaines protéiques montre que la protéine PhyR possède un domaine receveur typique des régulateurs de réponse (gris) et un domaine similaire à RpoE de fonction inconnue qui pourrait se fixer à l'ADN (bleu). La protéine HK possède un domaine senseur périplasmique CHASE3 (vert), un domaine transmembranaire (violet) et un domaine ATPase de type histidine kinase (orange). (C) Modèle de fonctionnement du système PhyR-NepR. Suite à un signal comme un stress membranaire (éclair), le senseur HK (en rouge) phosphoryle le régulateur PhyR et l'active. Une fois phosphorylé, PhyR-P actif augmente son affinité pour NepR. De cette façon, le facteur sigma RpoE1 est libéré et activé, ce qui permet l'activation des gènes dépendant de RpoE1. D'après le schéma proposé par Francez-Charlot (Francez-Charlot *et al.*, 2009).

Les facteurs sigma ECF sont souvent co-transcrits avec un senseur potentiel ancré en membrane (Helmann, 2002) (Helmann, 2006) (Potvin *et al.*, 2008). De plus, chez *E. coli* le système à deux composantes Cpx agit en coopération avec RpoE (Rowley *et al.*, 2006). Chez *Brucella*, il est donc probable que cette histidine kinase et PhyR forment un système avec RpoE1.

Récemment, un nouveau mécanisme de régulation du stress fut proposé chez *M. extorquens* AM1 et pourrait être répandu chez les α -protéobactéries (Francez-Charlot *et al.*, 2009). Le régulateur PhyR a la particularité d'être composé de deux domaines appartenant à des systèmes différents: un domaine similaire à un facteur ECF lié au domaine receveur d'un régulateur de réponse (Figure 67B). Un autre régulateur nommé NepR semble jouer le rôle d'anti-facteur sigma de RpoE1. Dans le modèle de *M. extorquens* AM1, PhyR est phosphorylé suite à un stress. La phosphorylation de PhyR favorise la liaison avec NepR, et a pour conséquence de libérer le facteur RpoE.

Bien que le gène *nepR* ne soit pas officiellement annoté chez *Brucella*, l'analyse de la séquence nucléotidique en amont de *rpoE1* démontre qu'il est bel et bien présent (Gourion *et al.*, 2008). Chez *Brucella*, cette séquence est similaire à l'ORF SMc01505 de *S. meliloti* et CC3476 de *C. crescentus*. Notons que cette ORF est aussi décrite pour encoder un régulateur qui inhibe l'activité de RpoE2 chez *S. meliloti* (Sauviac *et al.*, 2007). Or, RpoE2 est l'homologue de RpoE1 de *Brucella*.

En tenant compte du schéma décrit chez *M. extorquens* AM1 nous pouvons également imaginer un schéma de régulation de RpoE1 chez *Brucella* (Figure 67C). Suite à un stress périplasmique, nous proposons que l'histidine kinase encodée par BMEI0370 phosphoryle PhyR et active celui-ci. L'activation de PhyR favorise la liaison à NepR et libère RpoE1.

Le mécanisme d'action de ce système sur les gènes flagellaires reste à être exploré, néanmoins nous pouvons envisager qu'un stress périplasmique contrôle l'activation ou l'inactivation du flagelle de *Brucella* via ce système.

3.2.8. Modèle récapitulatif de régulation du flagelle de *Brucella*

Afin de faciliter la compréhension de l'intégration des différents régulateurs dans un modèle de régulation flagellaire, nous proposons un schéma récapitulatif reprenant les différents régulateurs cités ci-dessus (Figure 68).

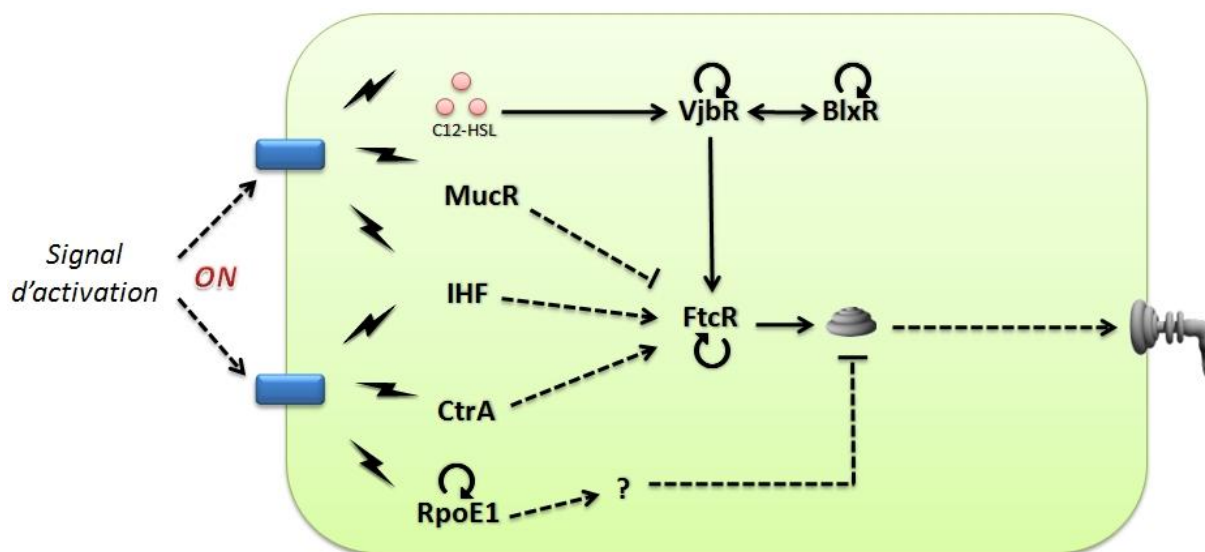


Figure 68 : Schéma de régulation flagellaire de *Brucella melitensis*. Un signal environnemental active les régulateurs (⚡) via des récepteurs membranaires (en bleu). Flèche pleine, interaction directe et expérimentalement démontrée; flèche pointillée, interaction établie sur base d'hypothèses. Ligne pointillée, répression hypothétique. ⤵, autorégulation.

Ce schéma ne reprend que les régulateurs impliqués dans la régulation à la base du contrôle flagellaire. Suite à un signal d'activation, ces régulateurs vont être activés et vont enclencher (ou stopper) l'assemblage du flagelle. Une fois l'assemblage du flagelle enclenché,

d'autres régulateurs interviennent comme point de contrôle sur cet assemblage (voir point 4 de l'introduction). Cette étape de la régulation correspond à la régulation interne de la Figure 64. Comme nous allons le voir, nous avons mis au jour un point de contrôle chez *Brucella* qui s'exerce sur la production de la flagelline.

3.3. Régulation de la flagelline de *Brucella* par FlbT et FlaF

Afin de mieux comprendre la régulation de la flagelline dans l'assemblage du flagelle de *Brucella*, nous avons également étudié l'implication de régulateurs spécifiques potentiels. Les régulateurs FlbT et FlaF contrôlent la production de flagelline chez *C. crescentus* et semblent conservés chez les autres Rhizobiales.

3.3.1. FlbT est un activateur de la flagelline de *Brucella*

L'expression des gènes flagellaires de *Brucella* n'est pas homologue au système en IV classes de *C. crescentus*. Cependant, le gène du régulateur FlbT nécessaire au passage de l'expression des gènes de classe III à la classe IV chez *C. crescentus* est également présent chez *Brucella*.

Chez *C. crescentus*, FlbT réprime la production de la flagelline FljK (Mangan *et al.*, 1999). FlbT agit au niveau post-transcriptionnel en se liant à la partie 5' non traduite UTR de l'ARNm de la flagelline. Cette liaison perturbe la structure secondaire de l'ARNm de la flagelline et diminue sa stabilité (Anderson and Gober, 2000). Grâce à ce système de régulation, la flagelline n'est produite que lorsque la partie proximale du flagelle jusqu'au coude est déjà assemblée.

Bien que FlbT n'ait été étudié que chez *C. crescentus*, il est présent également chez d'autres α -protéobactéries dont *Brucella* (Figure 69). Néanmoins, FlbT a un effet inverse chez *Brucella*. En absence du gène *flbT*, la flagelline de *Brucella* n'est plus produite.

La flagelline n'est produite qu'au début de la phase exponentielle de croissance (Fretin *et al.*, 2005). Cette production s'arrête en fin de phase exponentielle et en phase stationnaire. Cette absence de flagelline pourrait être causée par l'absence de FlbT.

Lorsque l'on produit constitutivement FlbT tout au long de la croissance, la production de flagelline ne s'arrête pas, même en phase stationnaire. Ces résultats démontrent que contrairement à *C. crescentus*, FlbT est un activateur de la flagelline chez *Brucella*.

3.3.2. La production de flagelline par FlbT est dépendante de FtcR

La mutation du gène codant le régulateur maître FtcR provoque une disparition de l'expression des gènes flagellaires, dont une absence de production de flagelline (Leonard *et al.*, 2007). L'absence de flagelline est également observée pour un mutant du gène *flbT*.

En supposant que FtcR contrôle la production de tous les gènes flagellaires, il est possible qu'il régule aussi *flbT*. Dans ce cas, l'absence de flagelline observée dans le mutant *ftcR* serait indirectement due à une absence de FlbT.

Pour tester cette hypothèse, nous avons exprimé constitutivement *flbT* dans un mutant *ftcR*. Cette expression permanente en *trans* rétablit la production de la flagelline dans le mutant *ftcR*. Ce résultat suppose que FtcR active la production de FlbT, qui ensuite, contrôle la production de flagelline. En fonction de ce résultat, on peut considérer que FlbT est un point de contrôle pour la production de flagelline tout comme chez *C. crescentus*.

3.3.3. Conservation du rôle de *FlbT* chez les *Rhizobiales*

FlbT est conservé chez les α -protéobactéries, et est également présent chez les autres *Rhizobiales* proches de *Brucella* (Figure 69).

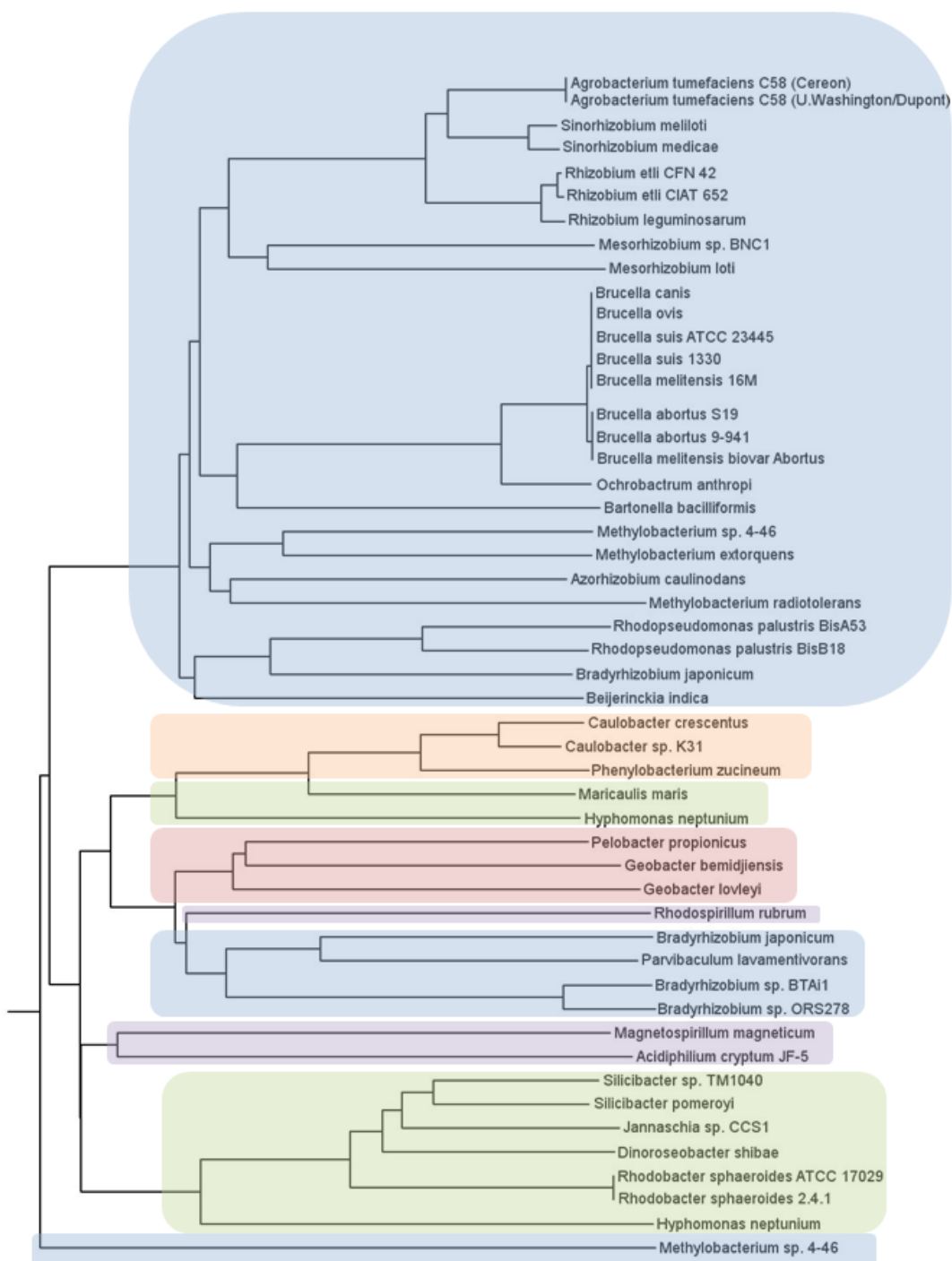


Figure 69 : Arbre phylogénétique de la protéine *FlbT* reconstruit en utilisant le site KEGG (méthode N-J avec longueur des branches). Chez les α -protéobactéries, membres des *Rhizobiales* (bleu), membres de *Caulobacterales* (orange), membres des *Rhodobacterales* (vert), membres des *Rhodospirillales* (mauve). Les membres des *Desulfuromonadales* chez les δ -protéobactéries sont en rouge.

La régulation du système flagellaire de *Sinorhizobium meliloti* présente plusieurs similitudes avec celui de *Brucella*, non seulement sur l'organisation génomique des gènes flagellaires mais également sur la spécificité des régulateurs (Leonard *et al.*, 2007) (Rotter *et al.*, 2006) (Eggenhofer *et al.*, 2006).

Bien que *flbT* soit conservé chez plusieurs α -protéobactéries, nous constatons que le rôle de FlbT est opposé à celui décrit chez *C. crescentus*. Pour déterminer si la fonction de FlbT est conservée chez les Rhizobiales, nous avons exprimé *flbT* de *S. meliloti* dans le mutant *flbT* de *Brucella*. Cette complémentation restaure drastiquement la production de flagelline dans le mutant *flbT* de *Brucella*.

Cela prouve que le rôle d'activateur de FlbT est sans doute conservé chez les Rhizobiales. Par contre, la complémentation dans les mêmes conditions avec le gène *flbT* de *C. crescentus* ne restaure pas la production de flagelline. Ce résultat, en plus du fait que FlbT est un répresseur chez *C. crescentus*, montre que *flbT* de *C. crescentus* et de *B. melitensis* ont divergé évolutivement pour ne plus avoir la même fonction.

3.3.4. FlaF est un antagoniste de FlbT et inhibe la production de flagelline

La régulation de la flagelline de *C. crescentus* fait également intervenir un autre régulateur. Chez *C. crescentus*, le gène *flaF* se situe juste en aval de *flbT* et code un petit polypeptide de 11.5 kDa qui possède un rôle antagoniste à FlbT. Contrairement à FlbT, FlaF favorise la traduction et la production de la flagelline (voir introduction point 4.2) (Llewellyn *et al.*, 2005).

Le gène *flaF* est également présent chez les α -protéobactéries qui possèdent *flbT*. Chez les Rhizobiales, les gènes *flaF* et *flbT* sont situés juste l'un à côté de l'autre mais de façon inverse à l'organisation génomique de *C. crescentus* (Figure 70).

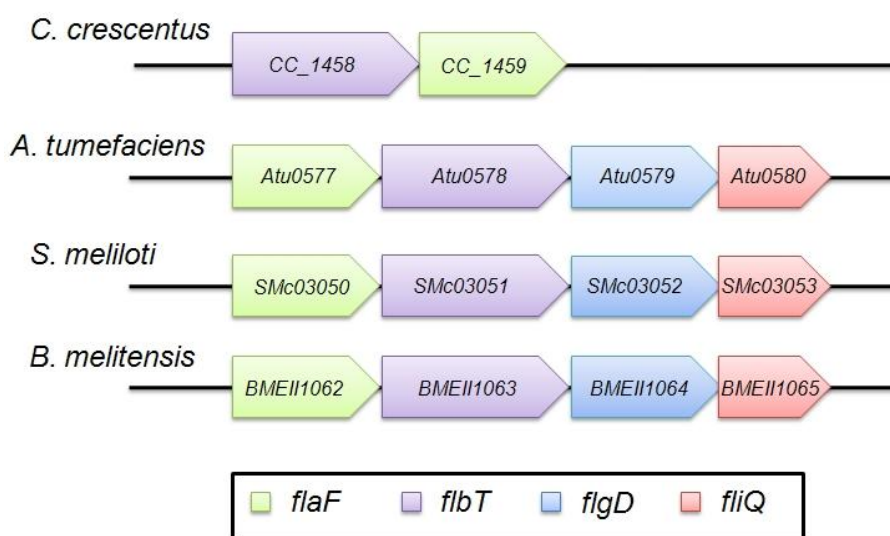


Figure 70 : Organisation génomique de *flaF* et *flbT* chez les Rhizobiales (*Agrobacterium tumefaciens*, *Sinorhizobium meliloti* et *Brucella melitensis*) et chez *C. crescentus*.

En supposant que comme chez *C. crescentus*, FlaF a un rôle antagoniste à FlbT, nous avons également étudié brièvement FlaF. Le mutant *flaF* n'a pas été réalisé lors de cette thèse, mais afin d'avoir des données préliminaires sur le rôle de FlaF sur la flagelline de *Brucella*, nous avons surexprimé *flaF* dans une souche sauvage de *B. melitensis*.

En produisant constitutivement *flaF*, nous constatons que la production de flagelline est inhibée. Il semblerait donc que FlaF agisse également comme un antagoniste de FlbT chez *Brucella*, et agirait comme un répresseur de la production de flagelline. La régulation de la flagelline semble conservée chez les Rhizobiales, et chez *S. meliloti* Rem active l'expression de *flaF* (Bahlawane *et al.*, 2008). Les gènes *flaF* et *flbT* semblent en opéron et nous supposons que FtcR (homologue à Rem) active l'expression de FlbT. Chez *C. crescentus*, il est montré que *flaF* et *flbT* constituent bien un opéron (Llewellyn *et al.*, 2005). Sur base de ces résultats, nous pouvons supposer que FtcR active aussi l'expression de *flaF* chez *Brucella*.

3.3.5. Régulation post-transcriptionnelle de la flagelline

Lors de ce travail, nous avons montré que FlbT et FlaF contrôlent la production de flagelline chez *Brucella*.

Comme chez *C. crescentus*, FlbT et FlaF de *Brucella* pourraient se lier à l'ARNm de la flagelline et contrôler sa traduction en modifiant sa structure secondaire. Nous avons montré que la quantité d'ARNm de la flagelline était moins importante dans un mutant *flbT* comparé à une souche sauvage de *B. melitensis*.

FlbT pourrait donc stabiliser la structure de l'ARNm de la flagelline chez *Brucella* pour permettre la traduction de la flagelline. De plus, la quantité d'ARNm de *flaF* est plus importante dans un mutant *flbT*, ce qui pourrait indiquer que FlbT déstabiliserait la structure de l'ARNm de son propre opéron.

La régulation post-transcriptionnelle de la flagelline existe aussi chez d'autres bactéries. Chez *H. pylori*, bien que le système soit différent, la protéine HP0958 se lie également à l'ARNm de la flagelline FlaA et la déstabilise (Douillard *et al.*, 2008). Que ce soit chez *C. crescentus* ou *H. pylori*, les auteurs proposent qu'un antagoniste agisse également sur la stabilité de l'ARNm de la flagelline par compétition (Anderson and Gober, 2000) (Douillard *et al.*, 2008). Notons que chez *S. tyhimurium*, le régulateur FljA se fixe également sur la partie UTR non traduite de l'ARNm de la flagelline FliC et empêche sa traduction (Aldridge *et al.*, 2006a) (Aldridge *et al.*, 2006c).

En conclusion nous avons montré dans ce travail qu'un point de contrôle existe sur la production de la flagelline et que les régulateurs FlbT et FlaF sont impliqués, sans doute au niveau post-transcriptionnel (Voir partie Conclusion).

3.4. La disparition du flagelle

L'analyse d'une culture liquide de *Brucella* montre que l'expression des gènes flagellaires et la production des protéines flagellaires ne sont observées qu'au début de la

phase exponentielle, en débutant à une DO_{600} d'environ 0.15 et en se terminant vers une DO_{600} d'environ 0.35.

Après cette période, l'expression des gènes flagellaires chute et la production de protéines flagellaires disparaît. De même, le flagelle de *Brucella melitensis* est observable en microscopie optique ou électronique que durant cette courte période. En dehors de cette fenêtre d'activation flagellaire, aucune *Brucella* flagellée n'est observable. A cause de cette détection difficile, *Brucella* fut longtemps considérée comme non flagellée.

Brucella possède donc un mécanisme qui permet d'éteindre les gènes flagellaires, et sans doute un mécanisme pour faire disparaître le flagelle chez les *Brucella* flagellées. Notons que l'observation d'une population flagellée de *Brucella* montre un nombre important de flagelles détachés. Les flagelles peuvent se détacher lors de la manipulation des bactéries pour l'observation, mais peut être aussi par un mécanisme actif d'éjection du flagelle.

3.4.1. Arrêt de la transcription des gènes flagellaires

La disparition brutale des protéines flagellaires est probablement due à un arrêt de l'activation des promoteurs flagellaires. Nous constatons en effet que l'activité des promoteurs *fliF*, *flgE* et *fliC* diminue drastiquement après cette période (Fretin *et al.*, 2005) (Delrue *et al.*, 2005).

Il est probable qu'une absence de FtcR produise une inactivation générale des gènes flagellaires. En effet, après une expression maximale du promoteur de *ftcR* en début de phase exponentielle, celle-ci diminue ensuite (Leonard *et al.*, 2007). De plus, nous avons vu que la production de flagelline est également contrôlée indirectement par FtcR. Lorsque nous sautons la régulation de la flagelline par FtcR en produisant constitutivement FlbT, nous constatons que la production de la flagelline n'est plus dépendante de la phase de croissance.

Chez *S. meliloti*, Rem (l'homologue de FtcR) est également produit durant la période exponentielle puis l'activité de son promoteur chute dramatiquement en phase stationnaire (Rotter *et al.*, 2006). La dégradation rapide de Rem est sans doute la cause de l'extinction du flagelle chez *S. meliloti* (Rotter *et al.*, 2006).

3.4.2. Ejection du flagelle

L'éjection du flagelle de *Brucella* par un mécanisme de protéolyse de la structure flagellaire pourrait également être impliquée.

Chez *C. crescentus*, le flagelle est éjecté suite à une destruction de la protéine FlhF (Grundling *et al.*, 2004). Cette partie de la structure basale est plus sensible à l'effet des protéases (Kanbe *et al.*, 2005). La protéase ClpAP reconnaît une séquence peptidique de la partie C-terminale de FlhF nécessaire à sa dégradation (Grunenfelder *et al.*, 2003) (Grunenfelder *et al.*, 2004).

Ce mécanisme pourrait être partagé par *Brucella*. La comparaison de séquence de *clpA* et de *clpP* de *C. crescentus* et de *B. melitensis* (gène BMEI0816 et gène BMEI0874) à l'aide

du programme BLASTN montre respectivement plus de 75% et 78% d'identité des séquences nucléotidiques entre ces 2 espèces. Chez *Brucella*, la partie C-terminale de FliF impliquée dans la dégradation est bien conservée et pourrait également être impliquée dans la dégradation de son flagelle (Figure 71).

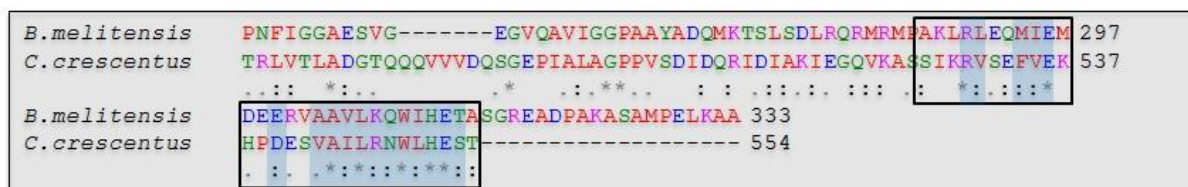


Figure 71 : Alignement de la séquence protéique C-terminale de FliF chez *B. melitensis* comparée à celle de *C. crescentus*. (*) Résidus identiques; (:) substitution conservée; (.) semi-substitution conservée. Partie encadrée, séquence impliquée dans la dégradation du flagelle. Code couleur disponible sur : www.ebi.ac.uk (EMBL-EBI, 2009).

PleD est une diguanylate cyclase impliquée aussi dans la dégradation de FliF (Aldridge and Jenal, 1999) (Paul *et al.*, 2004). Les diguanylates cyclases produisent le guanylate cyclique (c-di-GMP) à partir de 2 GTP et la formation de pyrophosphate (PPi). Le c-di-GMP est un messager qui est ensuite capable de se fixer à des domaines particuliers pour activer des régulateurs. Le c-di GMP intervient dans plusieurs schémas de régulation du flagelle (Wolfe and Visick, 2008).

Chez *C. crescentus*, PleD est responsable de la transition de la cellule flagellée en cellule immobile munie d'un pied. PleD possède deux domaines de régulateur de réponse et un domaine GGDEF de liaison au c-di-GMP. Une fois phosphorylé par DivJ et PleC, PleD forme un dimère qui possède une activité diguanylate cyclase.

Chez *Brucella*, un homologue de PleD (BMEII0660) est présent. De plus, un régulateur homologue à DivJ et PleC nommé PdhS a récemment été découvert chez *B. abortus* (Hallez *et al.*, 2007b). PdhS a une localisation polaire et serait impliqué dans un processus de différenciation cellulaire chez *Brucella*. La dégradation de FliF par une diguanylate cyclase pourrait donc aussi avoir lieu.

3.5. Hiéarchie des gènes flagellaires chez *Brucella*

L'assemblage de la structure flagellaire nécessite la coordination de l'expression d'une cinquantaine de gènes flagellaires chez *S. typhimurium* (Macnab, 2003). Pour faciliter cette régulation et éviter une dépense d'énergie trop coûteuse, la bactérie exprime les gènes flagellaires en classes de manière hiérarchique (Kalir *et al.*, 2001) (Soutourina and Bertin, 2003).

L'expression d'une classe de gènes nécessite l'expression de tous les gènes de la classe précédente. Les gènes s'activent donc par groupe, en commençant par les gènes impliqués dans la production de la partie proximale du flagelle et en terminant par les gènes impliqués dans la production de la partie distale. De cette façon, la flagelline n'est produite que si le

corps basal et le coude sont présents. Selon l'espèce bactérienne, les gènes flagellaires peuvent être groupés en 3 ou 4 classes (Voir Introduction point 4).

En suivant ce schéma, chez *S. typhimurium*, *E. coli* ou *H. pylori*, un mutant du gène *fliF* ne sécrète plus de protéines flagellaires et ne produit plus de flagelline (Aldridge and Hughes, 2002) (Macnab, 2003) (Allan *et al.*, 2000).

Le schéma de régulation semble différent chez *Brucella*. En effet, la flagelline et FlgE sont toujours produit dans un mutant *fliF*. Cela montre que la mutation de *fliF* n'affecte pas la régulation de ces protéines.

De manière similaire, la production de flagelline ne semble pas dépendante de la présence de la structure basale et du coude du flagelle chez *Bacillus thuringiensis* (Ghelardi *et al.*, 2002). Un mutant du gène *flhA* (codant un composant du système de sécrétion flagellaire) produit toujours de la flagelline mais celle-ci n'est pas sécrétée.

Nous pouvons en conclure que contrairement aux modèles bactériens *E. coli*, *S. typhimurium* ou *C. crescentus*, l'assemblage de la structure flagellaire n'affecte pas l'expression des gènes flagellaires chez *B. melitensis*.

Bien que nous n'ayons pu étudier l'export des protéines flagellaires, il semble impossible que les protéines flagellaires puissent être exportées sans FliF. Cependant, même dans un mutant *fliF*, l'expression de flagelline ou de FlgE disparaît après le début de phase exponentielle, ce qui montre que l'accumulation de protéines flagellaires dans la bactérie ne perturbe pas la régulation normale d'expression des gènes flagellaires menant à la disparition du flagelle.

Ces dernières années, l'étude du système flagellaire a montré que le scénario initial de régulation en classe hiérarchique était beaucoup plus complexe que présenté initialement (voir la partie Introduction point 4).

La bactérie *S. meliloti* est phylogénétiquement proche de *Brucella*. Pourtant, il s'agit d'une bactérie symbionte de plantes qui produit plusieurs flagelles péritriches non-gainés composés de 4 flagellines différentes (Scharf *et al.*, 2001). De plus, elle possède un système de chimiotactisme complexe (Schmitt, 2002). Or, *Brucella* est une bactérie pathogène animale produisant un flagelle polaire de type gainé constitué d'une seule flagelline et n'a aucun système de chimiotactisme.

Malgré ces différences, le système de régulation flagellaire de *Brucella* est similaire à celui de *S. meliloti*, tant sur le plan de l'organisation génomique que sur la spécificité des régulateurs flagellaires impliqués (Platzer *et al.*, 1997) (Fretin *et al.*, 2005) (Rotter *et al.*, 2006) (Leonard *et al.*, 2007).

Un schéma d'une cascade de régulation flagellaire hiérarchique a été établi chez *S. meliloti* (Figure 72A) (Sourjik *et al.*, 2000) (Rotter *et al.*, 2006). Dans ce schéma, les régulateurs de type LuxR, VisN et VisR sont les régulateurs au sommet de la hiérarchie et contrôlent la transcription de *rem* (Figure 72B et C). Le gène *rem* est dépendant de deux

promoteurs (P1 et P2), tout deux reconnus par VisNR. Rem s'autorégule par liaison au promoteur P1 (Figure 72A).

Les gènes de structure flagellaires sont sous la dépendance de Rem et VisNR et font partie des gènes de classe II. Les gènes de la flagelline FlaA et du système du chimiotactisme CheY1 sont groupés dans la classe III. En effet, la production de la flagelline FlaA et de la protéine du chimiotactisme CheY1 est diminuée dans un mutant *fliM* et *orf38* (codant une protéine potentielle du ceps basal).

Cependant, la mutation des gènes du moteur *motA*, *motB* et *motC* ne perturbe pas la production de FliM et de flagellines. Pour cette raison, ils sont groupés dans une classe IIB.

Notons que le gène *motD* présent chez les Rhizobiales a été récemment rebaptisé *fliK* (Eggenhofer *et al.*, 2006). La protéine FliK est un régulateur de la longueur du coude (voir point 2.2.1 de l'Introduction) (Waters *et al.*, 2007). Le gène *motD* (*fliK*) décrite chez *S. meliloti* est spécifique des Rhizobiales et se retrouve également chez *Brucella* (Platzer *et al.*, 1997).

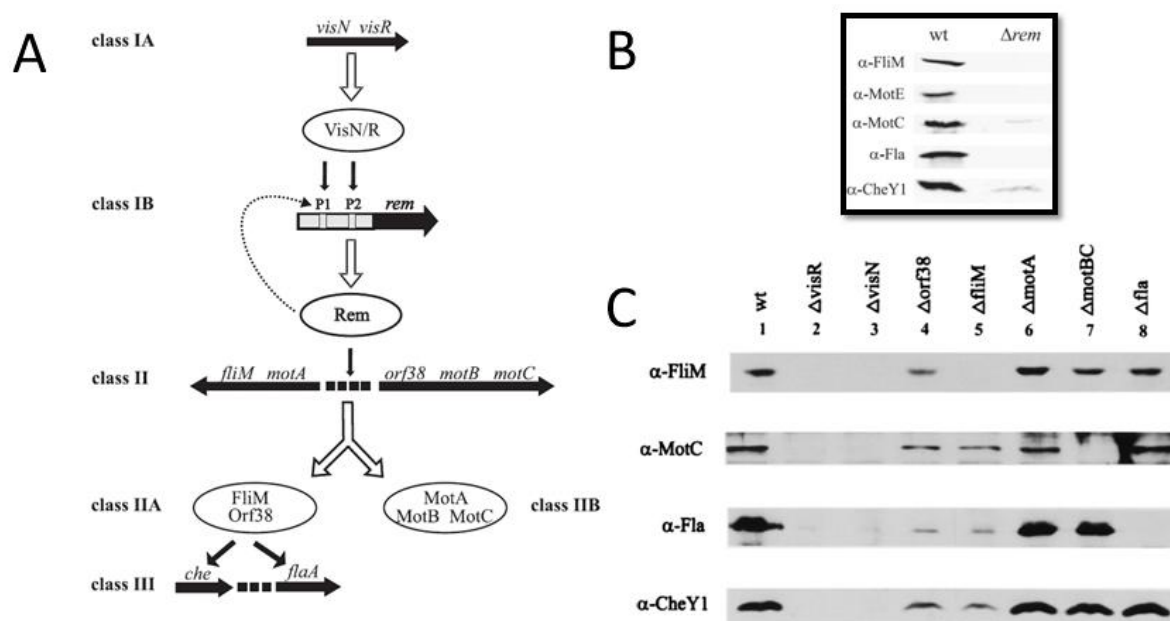


Figure 72 : Schéma de régulation en cascade hiérarchique du régulon flagellaire de *S. meliloti* (Rotter *et al.*, 2006). (A) Les gènes *visN*, *visR* et *rem* sont les gènes de classe I. Puisque VisNR contrôlent *rem*, ils ont été classé en IA et *rem* en IB. Les flèches horizontales représentent les opérons et les ellipses représentent les protéines produites. Un contrôle transcriptionnel positif est représenté par une flèche verticale noire et la traduction d'un gène par une flèche blanche. P1 et P2 désignent les deux promoteurs de *rem* et la ligne en pointillée l'auto-régulation par Rem. (B) Production des protéines FliM (α -FliM), MotC (α -MotC), MotE (α -MotE), CheY1 (α -CheY1) et de la flagelline (α -Fla) dans la souche sauvage (wt) et le mutant *rem* (Δrem) (Rotter *et al.*, 2006). (C) Idem, (sauf la protéine MotE) pour les mutants *visR* (2), *visN* (3), *orf38* (4), *fliM* (5), *motA* (6), *motBC* (7), flagelline (8) et la souche sauvage de *S. meliloti* (1) (Sourjik *et al.*, 2000).

Dans le schéma de hiérarchie flagellaire de *S. meliloti*, les auteurs suggèrent l'hypothèse d'un mécanisme inconnu de contrôle entre la classe II et III (Sourjik *et al.*, 2000) (Rotter *et al.*, 2006).

En comparaison avec *S. meliloti*, nous pouvons définir *ftcR* comme le gène de classe I chez *Brucella*, tous les gènes de structure jusqu'au coude en classe II. Bien que *Brucella* produise encore de la flagelline dans un mutant *fliF* et *flgE*, nous avons mis à jour la présence de régulateurs spécifiques de la flagelline.

Notons toutefois que dans l'expérience de Sourjik *et al.*, même si la production de flagelline et CheY1 est plus faible que dans la souche sauvage, elles sont toutefois toujours produites dans les mutants *fliM* et *orf38* (Figure 72C) (Sourjik *et al.*, 2000).

Chez *B. melitensis*, FlbT est nécessaire à la production de la flagelline alors que FlaF semble inhiber sa production. Ces régulateurs agissent comme un point de contrôle sur la production de flagelline. Pour ces raisons, nous classons également la flagelline parmi les

gènes de classe III. La manière dont FlbT et FlaF contrôlent la production de flagelline n'est pas connue chez *Brucella*. Cependant, par homologie avec *C. crescentus*, nous pouvons imaginer une fixation de FlbT et FlaF sur l'ARNm de la flagelline (Anderson and Gober, 2000) (Llewellyn *et al.*, 2005). FlbT stabiliserait l'ARNm de la flagelline pour permettre la traduction, alors que FlaF le déstabiliserait et provoquerait une destruction rapide due à l'instabilité de l'ARNm.

Malgré la présence de FlbT et FlaF, il n'est pas impossible que la régulation des gènes flagellaires de *Brucella* sorte de la régulation de type hiérarchique.

La régulation non-hiérarchique des gènes flagellaires est démontrée chez *L. monocytogenes* (Shen and Higgins, 2006). *L. monocytogenes* éteint l'expression de ces gènes flagellaires lorsque qu'elle infecte un hôte. Le signal d'extinction des gènes est une température de 37°C.

Contrairement aux autres bactéries qui utilisent un activateur transcriptionnel pour activer l'expression des gènes flagellaires, *L. monocytogenes* exprime ses gènes flagellaires constitutivement. A une température de 37°C, le régulateur MogR agit comme un répresseur sur tous les gènes flagellaires. Ce type de régulation compense l'absence du point de contrôle de type FliA/FlgM des entérobactéries (Shen and Higgins, 2006).

Le spirochète *Borrelia burgdorferi* ne possède pas non plus de cascade de régulation et a un système de régulation différent des autres bactéries (Li *et al.*, 2000). La plupart des gènes flagellaires de *B. burgdorferi* sont régulés par le facteur sigma 70 (Sal *et al.*, 2008).

Bien que généralement la flagelline soit reconnue par un facteur sigma 54 (RpoN) ou 28 (FliA) chez toutes les bactéries, le promoteur de la flagelline de *B. burgdorferi* possède un site de reconnaissance au facteur sigma 70 et est activement exprimé chez *E.coli* (Ge *et al.*, 1997b) (Ge *et al.*, 1997a) (Ge and Charon, 1997b) (Ge and Charon, 1997a). Notons que le promoteur de la flagelline de *Brucella* possède également un site de reconnaissance au facteur sigma 70.

Contrairement aux entérobactéries ou à *C. crescentus*, l'expression des gènes flagellaires n'a pas été extensivement étudiée chez les Rhizobiales.

4. L'effet de la densité de population sur la régulation du système flagellaire de *Brucella*

Comme nous l'avons vu, l'expression des gènes flagellaires est transitoire et ne se fait qu'à une faible densité de population (Fretin *et al.*, 2005). La production transitoire du flagelle lors de la croissance bactérienne est conservée chez d'autres espèces comme *S. meliloti* ou *H. pylori* (Rotter *et al.*, 2006) (Thompson *et al.*, 2003).

Les bactéries ont développé un système de communication appelé Quorum Sensing (QS). Ce système permet à une population bactérienne d'adopter un comportement coordonné par la synthèse, l'émission et la détection de petites molécules diffusibles nommées aussi « auto-inducteurs ». Parmi ces petites molécules, on retrouve des auto-inducteurs nommés AHL (*N*-acyl-L-homosérine lactone) chez les bactéries à Gram négatifs. Plus la population bactérienne augmente et plus les AHLs s'accumulent dans le milieu. Lorsqu'une concentration critique d'AHL est atteinte, la population bactérienne produit une réponse. L'expression du flagelle bactérien est une des réponses possibles (Daniels *et al.*, 2004).

Les *Brucella* produisent également des auto-inducteurs de type *N*-dodecanoyl-HSL (C₁₂-HSL) (Taminiau *et al.*, 2002). Les C₁₂-HSL produites par *Brucella* ont un effet répresseur sur la production du flagelle. En effet, l'ajout de C₁₂-HSL synthétiques dans le milieu de culture provoque une inhibition de la production des protéines flagellaires (Delrue *et al.*, 2005).

Les régulateurs de type LuxR sont capables de se lier aux AHLs, puis d'activer des gènes en se fixant sur des séquences cibles. Par l'intermédiaire de ces régulateurs, les AHLs sont capables de produire un changement d'expression génique. Chez *Brucella*, les deux régulateurs de type LuxR nommés VjbR et BxlR contrôlent l'expression des gènes flagellaires (Delrue *et al.*, 2001) (Delrue *et al.*, 2005) (Rambow-Larsen *et al.*, 2008).

Le gène *vjbR* se trouve au même emplacement génomique que le gène *visR* de *S. meliloti*. Or, *visR* est un gène de classe I impliqué dans l'activation du flagelle et code un régulateur de type LuxR (voir point 3.5) (Sourjik *et al.*, 2000). Comme pour *Brucella*, l'ajout d'AHL dans une culture de *S. meliloti* réprime l'expression des gènes flagellaires et a le même phénotype qu'un mutant *visR* (Hoang *et al.*, 2008).

Lors d'une infection de cellules, *Brucella* forme une vacuole (BCV) et suit un chemin intracellulaire rude la menant jusqu'au réticulum endoplasmique. C'est à ce moment que *Brucella* se réplique et croît dans la cellule.

On peut supposer que *Brucella* produise des molécules signal dans ces vacuoles. A cause de l'environnement restreint, les molécules ont une diffusion limitée, et s'accumuleraient dans cette vacuole. Ce modèle d'« Efficiency Sensing » est une variante du système de « Quorum Sensing » (Hense *et al.*, 2007). Ensuite, la réplication des *Brucellae* augmenterait encore le nombre de molécules signal produites.

En suivant cette hypothèse, et puisque le promoteur de *fliF* est actif en cellule, on pourrait imaginer que le système flagellaire soit nécessaire au début de l'infection en cellule, puis soit réprimé par les molécules signal résultant de l'augmentation de la population.

Il est également possible que dans l'environnement *Brucella* vive parfois en communauté, par exemple en formant des biofilms ou des microcolonies, et que parfois elle se retrouve seule. Dans ce contexte, on peut imaginer que la vie en communauté soit une condition avantageuse pour sa survie et sa croissance (Uzureau *et al.*, 2007), et que la production du flagelle ne soit pas nécessaire. Par contre, lorsqu'elle se retrouve seule, la production du flagelle lui permettrait de se déplacer pour trouver une condition plus favorable à sa survie. D'autres études devraient encore être menées pour valider et étayer ces modèles.

5. Lien entre le flagelle et le système de sécrétion de type IV

La régulation des gènes flagellaires de *Brucella* est couplée à la régulation des gènes du système de sécrétion de type IV via les régulateurs VjbR et BlxR (Delrue *et al.*, 2005) (Rambow-Larsen *et al.*, 2008).

Récemment, certains effecteurs sécrétés par le système de sécrétion de type IV de *Brucella* ont été mis en évidence par détection du site de reconnaissance nucléotidique de VjbR (de Jong *et al.*, 2008). Notons que parmi les cibles de VjbR nous retrouvons *ftcR* et *fliC*, ce qui correspond au schéma de hiérarchie flagellaire de *S. meliloti* (voir Figure 72).

Chez d'autres bactéries, il existe également des liens entre le flagelle et les systèmes de sécrétion. Par exemple, chez *P. aeruginosa*, la production du flagelle et du système de sécrétion de type III non flagellaire (SST3) sont inversement contrôlés l'un par rapport à l'autre (Soscia *et al.*, 2007). L'absence du flagelle provoque une surproduction du SST3 et inversement. Notons également que chez *Salmonella*, la sécrétion de flagelline dans le cytosol de la cellule est dépendante du SST3, mais non du système de sécrétion flagellaire (Sun *et al.*, 2007).

Chez *L. pneumophila*, la flagelline serait sécrétée dans le cytosol de la cellule via le système de sécrétion de type IV (Miao *et al.*, 2007). Puisque *Brucella* est également une bactérie intracellulaire qui utilise un système de sécrétion de type IV lors de l'infection, elle pourrait aussi utiliser ce mécanisme. Ces exemples montrent que les différents systèmes de sécrétion interagissent entre eux via une régulation commune.

La régulation des gènes flagellaires est souvent couplée avec celle d'autres gènes de virulence. Chez *S. meliloti*, l'expression des gènes flagellaires est couplée avec les gènes impliqués dans la production d'EPS (Exopolysaccharides) (Yao *et al.*, 2004). Ces EPS sont impliquées dans la formation de biofilms. *Brucella* produit également des EPS, et leur production et/ou leur export est contrôlé par VjbR (Uzureau *et al.*, 2007).

Plusieurs régulateurs transcriptionnels de gènes flagellaires sont aussi liés à d'autres gènes impliqués dans la virulence (Ramos *et al.*, 2004). Par exemple, le régulateur de réponse SirA de *S. typhimurium* active des gènes de virulence mais est également capable d'activer la transcription des gènes flagellaires (Goodier and Ahmer, 2001).

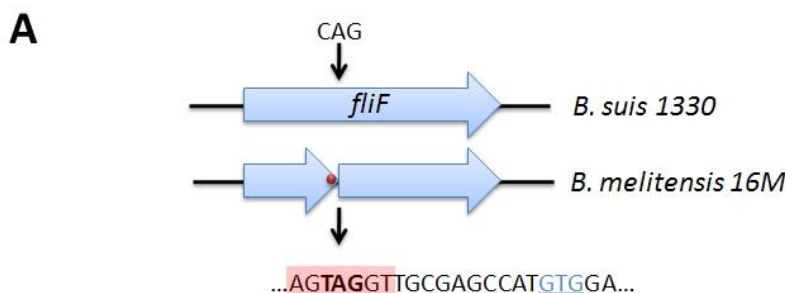
Chez *V. cholerae*, en réponse aux conditions environnementales, le système de régulation ToxR coordonne la transcription des gènes flagellaires et des gènes spécifiques de virulence (Krukonis and DiRita, 2003a) (Krukonis and DiRita, 2003b). Au contraire, le système BvgAS de *Bordetella bronchiseptica* réprime la transcription des gènes flagellaires et active l'expression de facteurs de virulence (Akerley *et al.*, 1992). Chez *Listeria monocytogenes*, c'est le répresseur transcriptionnel MogR qui régule à la fois des gènes de virulence et réprime les gènes flagellaires (Grundling *et al.*, 2004). Chez *Xenorhabdus nematophila*, la protéine flagellaire FliZ est responsable de la virulence de la bactérie. FliZ est en opéron avec le facteur sigma FliA, et contrôle la production d'hémolysine et de toxines

(Lanois *et al.*, 2008). L'expression d'hémolysine est donc dépendante de l'expression du système flagellaire.

Ces quelques exemples démontrent que le système flagellaire des bactéries est intimement lié à leur système impliqué dans la virulence. Il s'agit donc plus qu'un simple système de locomotion. Pour cette raison, il est essentiel de mieux comprendre le rôle du système flagellaire de *Brucella*, et le lien avec sa virulence (Letesson *et al.*, 2002).

6. Le flagelle comme source de spéciation de *Brucella* ?

L'analyse des gènes flagellaires de *Brucella* montre que certains gènes sont victimes d'une interruption prématurée par un codon stop ou d'un décalage dans le cadre de lecture (Figure 73A) (Fretin *et al.*, 2005) (Chain *et al.*, 2005).



B

Gènes	<i>B. melitensis</i> 16M	<i>B. suis</i> 1330	<i>B. abortus</i> 9-941	<i>B. abortus</i> 2308
<i>fliM</i>	+	STOP	Frameshift	Frameshift
<i>flhA</i>	STOP	+	Frameshift & STOP	Frameshift & STOP
<i>fliG</i>	+	STOP	Frameshift	+
<i>flgI</i>	Frameshift	+	STOP	STOP
<i>fliF</i>	STOP	+	+	+
<i>motC</i>	+	Frameshift	+	+

Figure 73 : Mutation dans les gènes flagellaires des espèces de *Brucella*. (A) Exemple de mutation du gène *fliF* de *B. melitensis* qui décompose le gène *fliF* en deux ORFs. Comparé au gène *fliF* de *B. suis*, le codon CAG est remplacé par un codon TAG (en gras) et provoque un arrêt prématuré de la séquence. Cependant, la présence d'une séquence de Shine-Dalgarno en amont pourrait ré-initier la traduction (rouge). Le codon « start » de la deuxième ORF est souligné en bleu. (B) Comparaison des gènes flagellaires présentant des différences entre les souches de *B. melitensis* 16M, *B. suis* 1330, *B. abortus* 9-941 et *B. abortus* 2308. Les cases vertes (+) représentent un gène complet, et les cases rouges un changement dans le gène qui perturbe l'ORF. Ces changements peuvent être un arrêt prématuré de la séquence par un codon d'arrêt (STOP) ou un changement dans le cadre de lecture (Frameshift) (Yu *et al.*, 2007).

Par exemple, les gènes *fliF* et *flhA* de *B. melitensis* sont interrompus par un codon stop ambre UAG (Figure 73) (Fretin *et al.*, 2005). Le gène *fliF* est donc composé des ORFs BMEII0151 et BMEII0152, et le gène *flhA* des ORFs BMEII0166 et BMEII0167. Cette interruption prématurée de la traduction laisse certains auteurs supposer que ces gènes se sont transformés en pseudogènes non fonctionnels au cours de l'évolution (Moreno *et al.*, 2002) (Chain *et al.*, 2005).

Il est possible que la protéine FliF complète soit produite malgré la présence d'un codon stop au milieu du gène. Par exemple, les Archaeobactéries sont capables de sauter le stop traductionnel généré par le codon ambre UAG, et de le remplacer par l'insertion d'une

pyrrolysine (Longstaff *et al.*, 2007a). Ce système pourrait être conservé également chez les bactéries (Longstaff *et al.*, 2007b).

Nous pouvons imaginer que *Brucella* ait un mécanisme similaire qui lui permette de sauter les codons d'arrêt. Nous pouvons également imaginer que la protéine FliF soit produite en deux parties. En effet, la deuxième ORF BMEII0152 est précédée d'une séquence potentielle de Shine-Dalgarno en amont du codon start. La traduction de la deuxième partie pourrait donc être initiée.

Contrairement à ce qui est proposé par certains auteurs, le système flagellaire ne semble pas être un vestige fossile chez *Brucella*. La mutation de la totalité du gène *fliF*, ou des ORFs BMEII0151 et BMEII0152 séparément, provoque une atténuation de la virulence en souris (Fretin *et al.*, 2005) (Nijskens, 2007).

Cela prouve que malgré l'interruption du gène *fliF* par un codon stop UAG, le gène est fonctionnel et la totalité du gène *fliF* (BMEII0151/BMEII0152) est nécessaire.

De plus, une structure flagellaire est bien produite, et l'analyse du filament d'une souche sauvage de *B. melitensis* montre la présence d'un filament entouré d'une gaine (Fretin *et al.*, 2005). Même si la production de la gaine était indépendante du reste du flagelle, la présence de pseudogènes empêchant la production du corps basal empêcherait la sécrétion de flagelline et son assemblage en filament. La présence d'un filament prouve que le système de sécrétion flagellaire (et donc le corps basal) est bel et bien fonctionnel.

Bien que la bactérie endosymbiotique *Buchnera* soit non mobile, les gènes flagellaires sont toujours nécessaires à son pouvoir infectieux, et ce, malgré la mutation de plusieurs gènes flagellaires essentiels (Toft and Fares, 2008) (Moya *et al.*, 2008).

Bien qu'elle ne possède plus de flagelline, *Buchnera* produit toujours une structure flagellaire de base (Maezawa *et al.*, 2006). Le système flagellaire a donc évolué, mais est toujours actif chez cette bactérie. Il est envisageable que le système flagellaire de *Brucella* soit également en cours d'évolution. Cette évolution pourrait également être spécifique de l'espèce.

Nous avons étudié principalement l'espèce *B. melitensis*. Cependant, l'analyse des génomes de *B. melitensis*, *B. abortus* et *B. suis* a révélé plusieurs différences entre leurs gènes flagellaires. Bien que l'organisation génomique soit la même entre les espèces, plusieurs gènes flagellaires présentent des modifications spécifiques (Chain *et al.*, 2005) (Figure 73).

Ces modifications génomiques ne sont pas spécifiques des gènes flagellaires et se retrouvent sur les deux chromosomes pour les 3 espèces (Figure 74). Ces différences génomiques pourraient être une cause de la préférence d'hôte et donc la cause de la spéciation des espèces de *Brucella*.

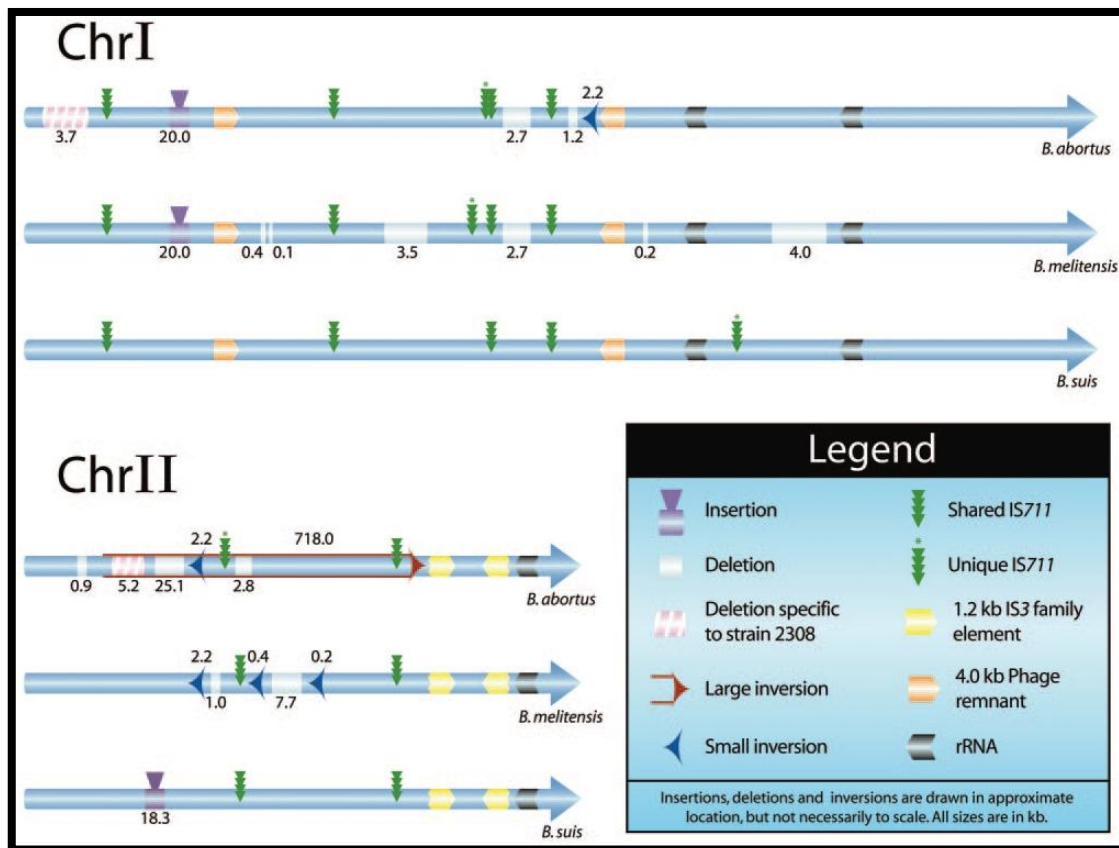


Figure 74 : Comparaison des modifications génomiques entre *B. abortus*, *B. melitensis* et *B. suis*. Les deux chromosomes sont représentés linéairement avec la localisation et la taille approximative des principales insertions, délétions et des éléments répétés. Les inversions génomiques sont également présentées (en rouge, et petite flèche bleues). La partie hachurée est une délétion génomique spécifique de la souche 2308 de *B. abortus*. Pour une meilleure compréhension du schéma, l'inversion du chromosome II de *B. abortus* a été volontairement retournée pour pouvoir comparer cette partie au chromosome II de *B. melitensis* et *B. suis* (Chain et al., 2005).

L'analyse de la production de flagelline chez *B. abortus* au cours de la croissance montre que la flagelline est produite tout au long de la croissance mais dans une quantité plus faible que chez *B. melitensis* (donnée non montrée et Figure 44).

Bien que l'organisation des promoteurs flagellaires soit conservée chez les différentes espèces de *Brucella*, notons qu'une courte séquence de 14 nucléotides est répétée dans le promoteur de *fliF* chez *B. abortus* et *B. suis*, mais n'est présente qu'en un seul exemplaire chez *B. melitensis*. Cette séquence pourrait être liée au site de reconnaissance de FtcR. Ces résultats indiquent que la régulation et/ou la production d'un flagelle puissent être différente selon les espèces de *Brucella*.

PARTIE V

PERSPECTIVES

V PERSPECTIVES

Les points abordés lors de cette thèse nous permettent d'élaborer plusieurs voies de recherche en perspective des résultats obtenus. Nous pouvons séparer cette partie en un thème « fonction et structure », et un autre thème « régulation ».

1. Perspectives sur la fonction et la structure du flagelle de *Brucella*

Bien que nous ayons démontré la production d'un flagelle chez *B. melitensis* dans nos conditions de culture, des conditions de culture optimales à l'étude du système flagellaire restent à découvrir. En effet, nous avons étudié l'expression du flagelle lors d'une croissance en milieu de culture riche 2YT. Ce milieu de culture est idéal pour la croissance de *Brucella* en laboratoire. Néanmoins, la faible proportion de bactéries flagellées dans la population bactérienne et la courte période de production du flagelle rendent toujours l'étude du flagelle de *Brucella* périlleuse. Pour ces raisons, il serait intéressant de tester d'autres conditions de culture. Par exemple, modifier la composition en nutriments du milieu ou à différentes variations de température. Notons aussi, que la culture en milieu appauvri semble favoriser l'expression flagellaire de *Brucella* (Thèse Sandrine (Léonard, 2005)). Il serait donc intéressant de continuer sur cette voie et tester des milieux plus pauvres ou similaires à ceux utilisés chez les autres Rhizobiales.

Une des fonctions naturellement attribuée au flagelle est la mobilité. Malgré la présence d'un flagelle polaire, aucune *Brucella* mobile n'a pu être observée. Si nous parvenions à trouver une condition plus favorable à la production du flagelle, nous pourrions également tester différentes concentrations de viscosité d'un milieu de culture mou (aussi appelé « milieu de mobilité »). En effet, il est possible que la production d'un flagelle polaire gainé favorise la mobilité sur ce substrat.

Une autre fonction récemment attribuée au flagelle est la sécrétion de protéines. Depuis peu, il est reconnu que la flagelline de *Legionella* et *Salmonella* est sécrétée dans la cellule lors d'une infection cellulaire. La flagelline sécrétée en intracellulaire est ensuite reconnue par le système immunitaire via les récepteurs cytosoliques Naip5 ou Ipaf. Par exemple, il serait intéressant de savoir si la flagelline de *Brucella* est aussi sécrétée et reconnue par des récepteurs cytosoliques Naip5 ou Ipaf. Premièrement, pour savoir si *Brucella* sécrète sa flagelline en cellule, nous pourrions par exemple marquer la flagelline avec l'épitope FLAG puis visualiser la présence de la flagelline en intracellulaire lors d'une infection cellulaire.

Puisque la flagelline peut potentiellement être sécrétée par le système de sécrétion flagellaire ou par le système de sécrétion de type IV, nous pourrions ensuite vérifier si la flagelline est sécrétée par ces deux mutants. Dans le cas où la flagelline serait sécrétée simultanément par les deux systèmes, un double mutant *virB-fliF* pourrait être construit et

testé de la même façon. Pour terminer, il serait intéressant d'étudier l'infection d'une souche sauvage de *Brucella* comparée à un mutant *fliC* dans des souris KO pour les récepteurs Naip5 et Ipaf.

Actuellement, les données d'infection obtenues avec les mutants flagellaires sont caractérisées en modèle murin. Nous observons une infection excacerbée du mutant *fliC* et *flbT* lors d'une infection murine. Dans notre expérience, nous inoculons les bactéries par voie intrapéritonéale et nous étalons les extraits de rates sur un milieu de culture. D'autres voies d'infection pourraient être testées, comme par exemple la voie nasale. De même, la technique d'« *in vivo* bioluminescent imaging » nous permettrait de visualiser et de suivre l'infection en modèle murin au cours du temps (Rambow-Larsen *et al.*, 2008).

Au cours de cette thèse, nous avons uniquement étudié la souche *B. melitensis*. Nous avons également montré que des différences s'observent au niveau des gènes flagellaires en fonction de l'espèce. Pour commencer, les neuf espèces de *Brucella* pourraient être analysées en microscopie électronique afin de détecter et caractériser le filament. Ensuite, et en fonction des résultats obtenus, l'étude approfondie du système flagellaire de certaines espèces pourrait être envisagée. Les souches de laboratoire peuvent être sujettes à des mutations qui affectent le système flagellaire. Dans cette optique, nous pourrions tester la mobilité d'une souche de *Brucella* provenant d'un hôte fraîchement infecté et ayant subi un nombre minimum de repiquages.

L'étude du système flagellaire de *Brucella* reste difficile en partie à cause de sa manipulation dans un laboratoire de haute sécurité (de niveau 3). La bactérie *Ochrobactrum anthropi* est une bactérie à Gram négatif très proche de *B. melitensis* (Velasco *et al.*, 1998). La disponibilité du séquençage de son génome montre, de manière surprenante, une très grande homologie avec le système flagellaire de *Brucella*. Toutes les ORFs sont conservées, ne présentent pas de mutation, et les 3 loci présents chez *Brucella* sont regroupés en un seul locus chez *O. anthropi*. De même, les homologues des gènes de tous les régulateurs flagellaires de *Brucella* tels FlbT, FlaF, FtcR et VjbR sont présents. Contrairement à *Brucella*, *Ochrobactrum* est considérée comme non pathogène pour les animaux et l'Homme (Delpino *et al.*, 2004). Actuellement, le système flagellaire d'*Ochrobactrum* n'est pas étudié, mais de par sa faible pathogénicité et sa grande ressemblance avec le système flagellaire de *Brucella*, *Ochrobactrum* constitue un modèle potentiel pour l'étude du flagelle de *Brucella*.

Notons que certains gènes flagellaires de *B. melitensis*, comme *fliF*, sont interrompus par un codon STOP. D'autres gènes dans le génome de *B. melitensis*, comme celui encodant une acylase potentielle, sont également interrompus (Thèse en cours de Julien Lemaire). Néanmoins, les données expérimentales tendent à montrer que ces gènes sont fonctionnels. Afin d'éclaircir ce mystère, nous pourrions remplacer ces gènes par un gène chimérique présentant un « tag » en partie C-terminale et N-terminale. De cette façon, nous pourrions savoir si le STOP est fonctionnel en vérifiant la taille de la protéine obtenue.

Concernant la structure du filament, la présence d'une gaine autour du flagelle reste surprenante et mystérieuse. La recherche des gènes impliqués dans la constitution de la gaine

reste un objectif intéressant. Parmi ces gènes, nous ciblerions les ORFs BMEII0148-0149 encodant des adhésines potentielles situées en amont du gène de la flagelline. D'autres ORFs pourraient également être impliquées (Figure 61). Pour vérifier cette hypothèse, il est envisageable de muter les ORFs et d'observer la structure du filament en microscopie électronique. Dans le cas d'une absence de gaine entourant le filament des mutants, une infection de souris et de cellules avec ces mutants permettrait de déterminer si la gaine joue un rôle dans la virulence de *Brucella*.

2. Perspectives sur la régulation du flagelle de *Brucella*

D'un point de vue régulation flagellaire, plusieurs pistes sont proposées. Tout d'abord, lors de ce travail, nous avons esquissé un schéma de hiérarchie flagellaire en 3 classes chez *Brucella*. Seuls quelques gènes flagellaires font partie de ce schéma. Pour compléter ce schéma, nous pourrions utiliser des techniques permettant une étude plus large des gènes flagellaires. Par exemple, l'utilisation de microarrays comme chez *P. aeruginosa* ou *C. crescentus* (Laub *et al.*, 2000) (Dasgupta *et al.*, 2003).

En étudiant un mutant *ftcR*, nous pourrions déterminer quels sont les gènes contrôlés par FtcR et peut-être déterminer les autres systèmes liés au système flagellaire. Pour étudier la hiérarchie d'expression des gènes flagellaires, nous pourrions également fusionner les promoteurs des gènes flagellaires à un gène rapporteur comme *gfp*, puis suivre l'activité de ces promoteurs au cours du temps comme cela a été réalisé pour *E. coli* (Kalir *et al.*, 2001).

Dans notre hiérarchie en 3 classes, nous avons montré que les gènes *flaF* et *flbT* sont impliqués dans la régulation de la flagelline chez *B. melitensis* et forment donc le point de contrôle des gènes de classe III. En perspective de ces résultats préliminaires, il serait intéressant de déterminer le mode d'action de FlbT et de FlaF sur la régulation de l'ARNm de la flagelline. Dans cette optique, nous pourrions construire un mutant *flaF*, puis quantifier la l'ARNm de la flagelline par RT-PCR et analyser la production de flagelline par Western Blot. Nous pourrions également purifier les protéines FlaF et FlbT afin de produire des anticorps. Les anticorps produits nous permettraient de détecter FlaF et FlbT tout au long de la croissance de *Brucella*, et de vérifier la corrélation entre ces deux régulateurs. Ensuite, la liaison de FlbT et FlaF à l'ARNm de la flagelline pourrait être testée par la technique de retard sur gel.

Les résultats de nos expériences démontrent un rôle du facteur sigma RpoE1 sur l'inhibition de l'ensemble des gènes flagellaires de *B. melitensis*. Il est fort probable que RpoE1 active l'expression d'un répresseur des gènes flagellaires. Par analyse bioinformatique, nous avons présenté 4 ORFs cibles potentielles de RpoE1.

Dans l'avenir, nous pourrions tester l'activité transcriptionnelle des promoteurs de ces 4 ORFs (BMEI0372, BMEII0475, BMEII0518 et BMEII0804) dans un mutant *rpoE1* afin de savoir si l'une des ORFs est activée par RpoE1. Pour rappel, l'ORF BMEII0372 est

homologue au gène *phyR* de *Methylobacterium extorquens* AM1. Pour ce faire, nous pourrions utiliser la même technique que pour les gènes flagellaires et fusionner les promoteurs au gène rapporteur *lacZ*.

Si l'activité de un ou plusieurs promoteurs est affectée par la mutation de *rpoE1*, il serait intéressant de muter le(s) gène(s) affecté(s) pour comparer ensuite l'expression des gènes flagellaires dans ce(s) mutant(s) par rapport à une souche sauvage.

Si l'un de ces régulateurs est bien le répresseur des gènes flagellaires, sa mutation provoquera sans doute une surexpression des gènes flagellaires comme dans le mutant *rpoE1*. Afin de découvrir la cible flagellaire de ce répresseur, nous pourrions aussi mesurer l'activité du promoteur de *ftcR* et *vjbR* dans les mutants obtenus. Pour ce faire, nous disposons déjà du promoteur de *ftcR* et *vjbR* fusionné au gène *lacZ* (Leonard *et al.*, 2007).

L'analyse du locus de *rpoE1* montre une homologie avec le système de régulation PhyR-NepR présent chez les α -protéobactéries (Francez-Charlot *et al.*, 2009). Bien que qu'il ne soit pas annoté dans le génome de *Brucella*, la séquence du gène *nepR* est présente en amont de *rpoE1*. Une amplification par RT-PCR (reverse transcriptase) permettrait de déterminer si *nepR* est bien transcrit. Ensuite, il serait intéressant de muter *nepR* pour vérifier s'il a également un rôle répresseur sur RpoE1 comme cela est décrit chez *S. meliloti* (Sauviac *et al.*, 2007). Dans ce cas, une mutation de *nepR* produirait une suractivation de RpoE1 et une inhibition probablement totale des gènes flagellaires. Dans cette optique, une surexpression de *nepR* devrait avoir un effet inverse, et lever la répression flagellaire.

L'étude du flagelle de *Brucella* en est à ses débuts. Néanmoins, nos découvertes préliminaires et nos premiers résultats ouvrent la porte à de nombreuses questions, et sans doute, à de nombreuses surprises.

PARTIE VI

CONCLUSION

VI CONCLUSION

Pour terminer, nous concluerons sur les buts atteints lors de ce travail. Cette thèse a permis de mettre en lumière une partie du fonctionnement du système flagellaire de *Brucella*.

Nous avons montré que *Brucella* est bien une bactérie flagellée. Pour la première fois, nous avons pu visualiser et analyser la structure du filament en microscopie. Contrairement à ce que supposaient certains auteurs, les gènes flagellaires de *Brucella* ne sont pas cryptiques et produisent bien une structure.

Ensuite, nous avons montré que la flagelline a un rôle particulier lors de l'infection et que celle-ci est au moins contrôlée par les régulateurs FlbT et FlaF.

Nous avons également détaillé le rôle du facteur sigma RpoE1 dans l'inhibition de l'expression du système flagellaire.

Toutes les données récoltées *in silico*, expérimentalement et dans la littérature spécialisée nous permettent de proposer un schéma de régulation flagellaire hypothétique (Figure 75). En comparaison avec le système flagellaire de *S. meliloti*, nous proposons une cascade de régulation hiérarchique flagellaire en 3 classes chez *Brucella*.

La production du flagelle est dirigée par le gène de classe I *ftcR*. FtcR est considéré comme le régulateur maître des gènes flagellaires et est répandu chez les Rhizobiales (Rotter *et al.*, 2006) (Leonard *et al.*, 2007). Il est démontré expérimentalement que FtcR se lie au promoteur de *fliF* et contrôle la production de FlgE et FliC (Leonard *et al.*, 2007).

VjbR et BlxR sont deux régulateurs de type LuxR qui ont également un rôle d'activateur des gènes flagellaires. Ces deux régulateurs activent leur propre transcription mais s'activent également réciproquement (Rambow-Larsen *et al.*, 2008). L'activité de *ftcR* est dépendante de *vjbR*, pour cette raison *vjbR* est situé en amont de *ftcR* dans cette cascade de régulation (Leonard *et al.*, 2007). Les trois régulateurs FtcR, VjbR et BlxR sont donc regroupés dans la classe I.

Notons que l'ajout de C₁₂-HSL dans le milieu mime l'effet d'un mutant *vjbR* sur les gènes flagellaires. De plus, une mutation dans le domaine de liaison aux HSLs de VjbR le rend insensible aux C₁₂-HSL synthétiques (Uzureau *et al.*, 2007). Il est probable que les C₁₂-HSL inhibent l'activité de VjbR sur les gènes flagellaires (Delrue *et al.*, 2005).

VjbR et BlxR sont à un carrefour entre la régulation du flagelle et du système de sécrétion de type IV (VirB) (Delrue *et al.*, 2005) (Rambow-Larsen *et al.*, 2008). Ils pourraient donc agir comme un aiguillage entre les deux systèmes.

FtcR est le centre d'activation des gènes flagellaires et est probablement la cible de plusieurs régulateurs pour pouvoir adapter la production du flagelle à l'environnement que la bactérie rencontre ou à son état physiologique.

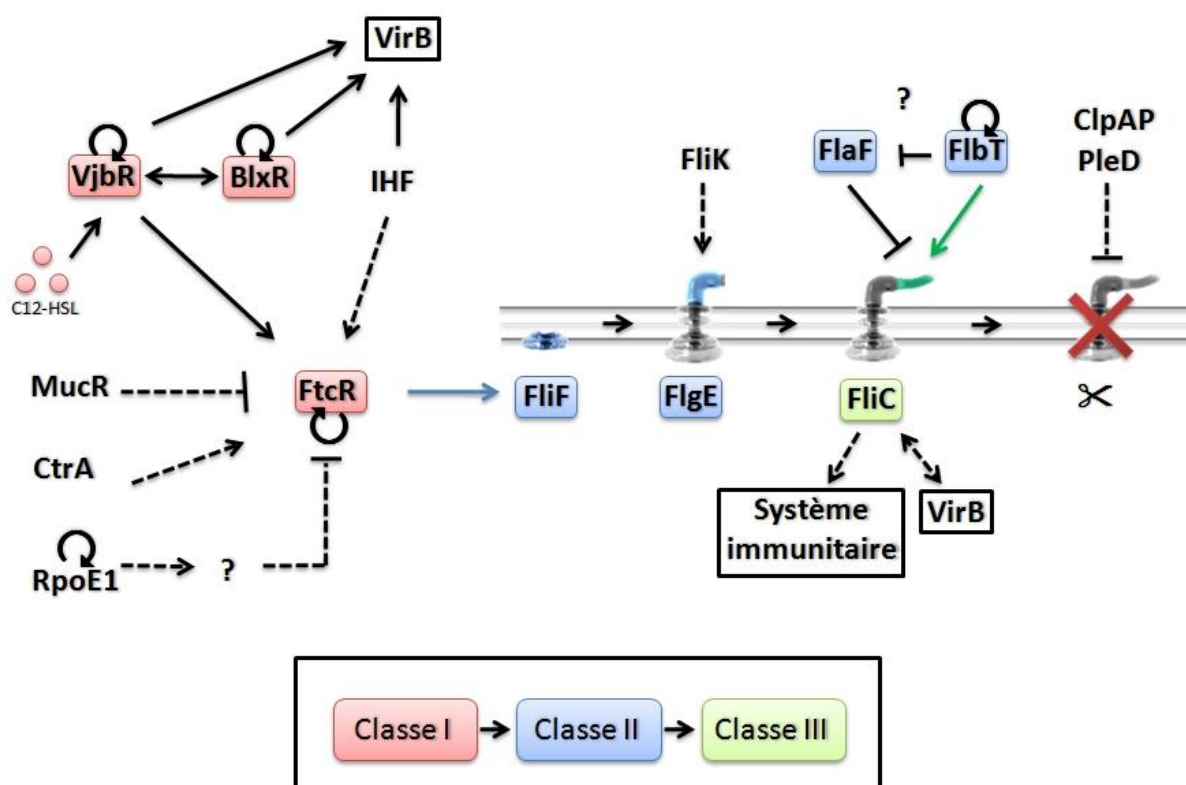


Figure 75 : Schéma de la cascade hiérarchique de régulation du flagelle de *Brucella*. Les gènes ayant un effet expérimentalement démontré dans la cascade de régulation sont marqués en rouge (classe I), en bleu (classe II) ou en vert (classe III). Les autres gènes ont une fonction hypothétique. Le passage de la classe I à la classe II est présenté par une flèche pleine bleue, et le passage de la classe II à la classe III par une flèche pleine verte. Une activation est présentée par une flèche pleine. Une action ou une activation hypothétique est présentée par une flèche en pointillée. Une barre représente une répression. Une auto-régulation est présentée par une flèche circulaire.

Nous avons montré que les gènes flagellaires sont inhibés par le facteur sigma RpoE1. La mutation de *rpoE1* induit une surexpression des gènes flagellaires *fliF*, *flgE*, *fliC*, *flbT* et *flaF* (voir la partie Résultats et l'article de Delory) (Delory *et al.*, 2006).

Nous envisageons que le facteur sigma RpoE1 contrôle l'expression d'un gène codant un inhibiteur des gènes flagellaires. Cet inhibiteur contrôle probablement directement ou indirectement *ftcR* pour contrôler les gènes flagellaires. Nous supposons également une auto-régulation de *rpoE1* chez *Brucella* tel que cela est décrit chez les autres bactéries (Rhodius *et al.*, 2006).

L'analyse *in silico* des promoteurs flagellaires nous laisse envisager un contrôle de l'expression des gènes flagellaires par les régulateurs IHF, MucR et CtrA. Comme *C. crescentus*, *Brucella* est une bactérie à division asymétrique qui pourrait être contrôlée par CtrA (Hallez *et al.*, 2004). Dans ce contexte, CtrA contrôlerait les gènes flagellaires en fonction du cycle cellulaire. Par comparaison avec *S. meliloti*, MucR inhiberait la

transcription de *fltR*. La récente découverte de formation de biofilm par *Brucella* (Uzureau *et al.*, 2007) ouvre la porte vers une régulation commune entre flagelle et biofilm.

Le régulateur IHF favorise l'expression de l'opéron VirB. Il se fixe au promoteur de *virB* et provoque un changement dans la courbe de l'ADN qui participe probablement à la régulation de la transcription de *virB* (Sieira *et al.*, 2004). Puisque le schéma de régulation de VirB est commun avec celui du flagelle, et puisque le promoteur de *fltR* possède une séquence consensus de liaison à IHF, nous envisageons qu'IHF soit un acteur potentiel de la régulation du flagelle de *Brucella*.

Dans notre schéma de régulation, FtcR active l'expression des gènes flagellaires de classe II. Par démonstration expérimentale, *fliF* et *flgE* font partie de ceux là, mais par déduction, nous pouvons probablement ajouter tous les autres gènes flagellaires. Notons que la taille du coude est probablement contrôlée par FliK (anciennement annoté MotD) comme chez *S. meliloti* (Eggenhofer *et al.*, 2006).

Le fait que la production de flagelline soit rétablie dans un mutant *fltR* complémenté avec *flbT*, prouve que FlbT agit comme un point de contrôle sur la flagelline. A partir de ce constat, nous classons le gène *fliC* dans les gènes de classe III.

Il est possible que le gène *fliC* soit transcrit constitutivement via le facteur sigma 70 mais que la régulation se fasse au niveau post-transcriptionnel. En supposant que le flagelle ne soit pas nécessaire, l'absence de FlbT ne permettrait pas la stabilisation de l'ARNm de la flagelline, et la traduction ne serait pas possible. Par contre, lorsque la production du flagelle est activée par FtcR, FlbT est produit et stabiliserait l'ARNm de la flagelline pour permettre la production de flagelline.

Le rôle de FlaF dans la répression de la production de flagelline est plus mystérieux, mais on peut imaginer qu'un système de « feed back » négatif permette de contrôler encore plus finement la production de flagelline. Par exemple par compétition pour le site de fixation à l'ARNm de la flagelline.

De plus, nous avons montré que la quantité de l'ARNm de *flaF* est moindre dans un mutant *flbT*. Puisque *flaF* et *flbT* sont en opéron, et en imaginant une régulation post-transcriptionnelle de FlbT sur son propre transcrit, nous pouvons supposer une autorégulation de *flbT*. A l'heure actuelle, nous ne savons pas comment FlaF et FlbT contrôle la production de flagelline. Des études supplémentaires sont nécessaires pour décrypter ce système de régulation.

En ce qui concerne la flagelline, nous avons montré que l'absence de flagelline exacerbe l'infection en souris. Il est donc probable que la flagelline agisse sur le système immunitaire indépendamment de la structure flagellaire. Récemment, des effecteurs du système de sécrétion de type IV ont été découverts chez *Brucella* (de Jong *et al.*, 2008). La présence d'un site de liaison de VjbR au promoteur de la flagelline suggère que celle-ci puisse être sécrétée par le système de sécrétion de type IV, et peut être agir sur le système immunitaire.

Pour terminer, la disparition du flagelle pourrait résulter d'une dégradation de la structure par une protéase. Par similitude avec *C. crescentus*, la protéase ClpAP et le régulateur PleD éjecteraient le flagelle par la dégradation de FliF.

En conclusion, ce travail nous a permis de décrire un nouveau schéma de régulation flagellaire chez *Brucella*. Ce schéma mériterait d'être exploré plus en profondeur dans l'avenir. Le décryptage du système flagellaire permettrait sans doute de mieux comprendre les mécanismes de virulence utilisés par *Brucella*.

PARTIE VII

BIBLIOGRAPHIE

VII BIBLIOGRAPHIE

- Akerley, B.J., Monack, D.M., Falkow, S., and Miller, J.F. (1992) The *bvgAS* locus negatively controls motility and synthesis of flagella in *Bordetella bronchiseptica*. *J Bacteriol* **174**: 980-990.
- Akerley, B.J., Cotter, P.A., and Miller, J.F. (1995) Ectopic expression of the flagellar regulon alters development of the *Bordetella*-host interaction. *Cell* **80**: 611-620.
- Akira, S., and Takeda, K. (2004) Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* **4**: 499-511.
- Aldridge, P., and Jenal, U. (1999) Cell cycle-dependent degradation of a flagellar motor component requires a novel-type response regulator. *Mol Microbiol* **32**: 379-391.
- Aldridge, P., and Hughes, K.T. (2002) Regulation of flagellar assembly. *Curr Opin Microbiol* **5**: 160-165.
- Aldridge, P., Gnerer, J., Karlinsey, J.E., and Hughes, K.T. (2006a) Transcriptional and translational control of the *Salmonella* *fliC* gene. *J Bacteriol* **188**: 4487-4496.
- Aldridge, P.D., Karlinsey, J.E., Aldridge, C., Birchall, C., Thompson, D., Yagasaki, J., and Hughes, K.T. (2006b) The flagellar-specific transcription factor, sigma28, is the Type III secretion chaperone for the flagellar-specific anti-sigma28 factor FlgM. *Genes Dev* **20**: 2315-2326.
- Aldridge, P.D., Wu, C., Gnerer, J., Karlinsey, J.E., Hughes, K.T., and Sachs, M.S. (2006c) Regulatory protein that inhibits both synthesis and use of the target protein controls flagellar phase variation in *Salmonella enterica*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 11340-11345.
- Allan, E., Dorrell, N., Foynes, S., Anyim, M., and Wren, B.W. (2000) Mutational analysis of genes encoding the early flagellar components of *Helicobacter pylori*: evidence for transcriptional regulation of flagellin A biosynthesis. *J Bacteriol* **182**: 5274-5277.
- Allen, R.D., and Baumann, P. (1971) Structure and arrangement of flagella in species of the genus *Beneckea* and *Photobacterium fischeri*. *J Bacteriol* **107**: 295-302.
- Amer, A., Franchi, L., Kanneganti, T.D., Body-Malapel, M., Ozoren, N., Brady, G., Meshinchi, S., Jagirdar, R., Gewirtz, A., Akira, S., and Nunez, G. (2006) Regulation of *Legionella* phagosome maturation and infection through flagellin and host Ipaf. *J Biol Chem* **281**: 35217-35223.
- Andersen-Nissen, E., Smith, K.D., Strobe, K.L., Barrett, S.L., Cookson, B.T., Logan, S.M., and Aderem, A. (2005) Evasion of Toll-like receptor 5 by flagellated bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 9247-9252.
- Anderson, D.K., and Newton, A. (1997) Posttranscriptional regulation of *Caulobacter* flagellin genes by a late flagellum assembly checkpoint. *J Bacteriol* **179**: 2281-2288.
- Anderson, P.E., and Gober, J.W. (2000) FlbT, the post-transcriptional regulator of flagellin synthesis in *Caulobacter crescentus*, interacts with the 5' untranslated region of flagellin mRNA. *Mol Microbiol* **38**: 41-52.
- Apel, D., and Surette, M.G. (2008) Bringing order to a complex molecular machine: the assembly of the bacterial flagella. *Biochim Biophys Acta* **1778**: 1851-1858.
- Arellano-Reynoso, B., Lapaque, N., Salcedo, S., Briones, G., Ciocchini, A.E., Ugalde, R., Moreno, E., Moriyon, I., and Gorvel, J.P. (2005) Cyclic beta-1,2-glucan is a *Brucella* virulence factor required for intracellular survival. *Nat Immunol* **6**: 618-625.

- Armitage, J.P., and Schmitt, R. (1997) Bacterial chemotaxis: Rhodobacter sphaeroides and Sinorhizobium meliloti--variations on a theme? *Microbiology* **143** (Pt 12): 3671-3682.
- Armitage, J.P., Pitta, T.P., Vigeant, M.A., Packer, H.L., and Ford, R.M. (1999) Transformations in flagellar structure of Rhodobacter sphaeroides and possible relationship to changes in swimming speed. *J Bacteriol* **181**: 4825-4833.
- Arora, S.K., Ritchings, B.W., Almira, E.C., Lory, S., and Ramphal, R. (1997) A transcriptional activator, FleQ, regulates mucin adhesion and flagellar gene expression in Pseudomonas aeruginosa in a cascade manner. *J Bacteriol* **179**: 5574-5581.
- Arora, S.K., Bangera, M., Lory, S., and Ramphal, R. (2001) A genomic island in Pseudomonas aeruginosa carries the determinants of flagellin glycosylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 9342-9347.
- Asai, T., Tena, G., Plotnikova, J., Willmann, M.R., Chiu, W.L., Gomez-Gomez, L., Boller, T., Ausubel, F.M., and Sheen, J. (2002) MAP kinase signalling cascade in Arabidopsis innate immunity. *Nature* **415**: 977-983.
- Attmannspacher, U., Scharf, B., and Schmitt, R. (2005) Control of speed modulation (chemokinesis) in the unidirectional rotary motor of Sinorhizobium meliloti. *Mol Microbiol* **56**: 708-718.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. E., Seidman, J. G., Smith, J. A. & Struhl, K. (1991) *Current protocols in Molecular Biology*: John Wiley & Sons.
- Badea, L., Beatson, S.A., Kaparakis, M., Ferrero, R.L., and Hartland, E.L. (2009) Secretion of flagellin by the LEE-encoded type III secretion system of enteropathogenic Escherichia coli. *BMC Microbiol* **9**: 30.
- Bahlawane, C., McIntosh, M., Krol, E., and Becker, A. (2008) Sinorhizobium meliloti regulator MucR couples exopolysaccharide synthesis and motility. *Mol Plant Microbe Interact* **21**: 1498-1509.
- Barabote, R.D., Xie, G., Leu, D.H., Normand, P., Necsulea, A., Daubin, V., Medigue, C., Adney, W.S., Xu, X.C., Lapidus, A., Detter, C., Pujic, P., Bruce, D.R., Lavire, C., Challacombe, J.F., Brettin, T.S., and Berry, A.M. (2009) Complete genome of the cellulolytic thermophile Acidothermus cellulolyticus 11B provides insights into its ecophysiological and evolutionary adaptations. *Genome Res.*
- Bardy, S.L., Ng, S.Y., and Jarrell, K.F. (2003) Prokaryotic motility structures. *Microbiology* **149**: 295-304.
- Barembuch, C., and Hengge, R. (2007) Cellular levels and activity of the flagellar sigma factor FliA of Escherichia coli are controlled by FlgM-modulated proteolysis. *Mol Microbiol* **65**: 76-89.
- Batut, J., Andersson, S.G., and O'Callaghan, D. (2004) The evolution of chronic infection strategies in the alpha-proteobacteria. *Nat Rev Microbiol* **2**: 933-945.
- Beatson, S.A., Minamino, T., and Pallen, M.J. (2006) Variation in bacterial flagellins: from sequence to structure. *Trends Microbiol* **14**: 151-155.
- Bellefontaine, A.F., Pierreux, C.E., Mertens, P., Vandenhoute, J., Letesson, J.J., and De Bolle, X. (2002) Plasticity of a transcriptional regulation network among alpha-proteobacteria is supported by the identification of CtrA targets in Brucella abortus. *Mol Microbiol* **43**: 945-960.
- Bennett, J.C., Thomas, J., Fraser, G.M., and Hughes, C. (2001) Substrate complexes and domain organization of the Salmonella flagellar export chaperones FlgN and FliT. *Mol Microbiol* **39**: 781-791.
- Benz, I., and Schmidt, M.A. (2002) Never say never again: protein glycosylation in pathogenic bacteria. *Mol Microbiol* **45**: 267-276.
- Berg, H.C. (2003) The rotary motor of bacterial flagella. *Annu Rev Biochem* **72**: 19-54.

- Bertram-Drogatz, P.A., Quester, I., Becker, A., and Puhler, A. (1998) The *Sinorhizobium meliloti* MucR protein, which is essential for the production of high-molecular-weight succinoglycan exopolysaccharide, binds to short DNA regions upstream of *exoH* and *exoY*. *Mol Gen Genet* **257**: 433-441.
- Blocker, A., Komoriya, K., and Aizawa, S. (2003) Type III secretion systems and bacterial flagella: insights into their function from structural similarities. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 3027-3030.
- Boin, M.A., Austin, M.J., and Hase, C.C. (2004) Chemotaxis in *Vibrio cholerae*. *FEMS Microbiol Lett* **239**: 1-8.
- Bonnot, S. (2007) Caractérisation du régulateur transcriptionnel VjbR appartenant au système de Quorum Sensing de *Brucella*. In *Unité de recherche en biologie moléculaire* Namur: FUNDP.
- Boussau, B., Karlberg, E.O., Frank, A.C., Legault, B.A., and Andersson, S.G. (2004) Computational inference of scenarios for alpha-proteobacterial genome evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 9722-9727.
- Brassinga, A.K., Siam, R., McSween, W., Winkler, H., Wood, D., and Marczyński, G.T. (2002) Conserved response regulator CtrA and IHF binding sites in the alpha-proteobacteria *Caulobacter crescentus* and *Rickettsia prowazekii* chromosomal replication origins. *J Bacteriol* **184**: 5789-5799.
- Braun, T.F., Poulson, S., Gully, J.B., Empey, J.C., Van Way, S., Putnam, A., and Blair, D.F. (1999) Function of proline residues of MotA in torque generation by the flagellar motor of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **181**: 3542-3551.
- Bresolin, G., Trcek, J., Scherer, S., and Fuchs, T.M. (2008) Presence of a functional flagellar cluster Flag-2 and low-temperature expression of flagellar genes in *Yersinia enterocolitica* W22703. *Microbiology* **154**: 196-206.
- Brown, J.D., Saini, S., Aldridge, C., Herbert, J., Rao, C.V., and Aldridge, P.D. (2008) The rate of protein secretion dictates the temporal dynamics of flagellar gene expression. *Mol Microbiol* **70**: 924-937.
- Brown, P.N., Terrazas, M., Paul, K., and Blair, D.F. (2007) Mutational analysis of the flagellar protein FliG: sites of interaction with FliM and implications for organization of the switch complex. *J Bacteriol* **189**: 305-312.
- Butler, S.M., and Camilli, A. (2005) Going against the grain: chemotaxis and infection in *Vibrio cholerae*. *Nat Rev Microbiol* **3**: 611-620.
- Canals, R., Altarriba, M., Vilches, S., Horsburgh, G., Shaw, J.G., Tomas, J.M., and Merino, S. (2006a) Analysis of the lateral flagellar gene system of *Aeromonas hydrophila* AH-3. *J Bacteriol* **188**: 852-862.
- Canals, R., Ramirez, S., Vilches, S., Horsburgh, G., Shaw, J.G., Tomas, J.M., and Merino, S. (2006b) Polar flagellum biogenesis in *Aeromonas hydrophila*. *J Bacteriol* **188**: 542-555.
- Carneiro, L.A., Magalhaes, J.G., Tattoli, I., Philpott, D.J., and Travassos, L.H. (2008) Nod-like proteins in inflammation and disease. *J Pathol* **214**: 136-148.
- Carrillo, C.D., Taboada, E., Nash, J.H., Lanthier, P., Kelly, J., Lau, P.C., Verhulp, R., Mykytczuk, O., Sy, J., Findlay, W.A., Amoako, K., Gomis, S., Willson, P., Austin, J.W., Potter, A., Babiuk, L., Allan, B., and Szymanski, C.M. (2004) Genome-wide expression analyses of *Campylobacter jejuni* NCTC11168 reveals coordinate regulation of motility and virulence by *flhA*. *J Biol Chem* **279**: 20327-20338.
- Casadevall, A. (2008) Evolution of intracellular pathogens. *Annu Rev Microbiol* **62**: 19-33.
- CDC (2009) CDC (Centers for Disease Control and Prevention) Bioterrorism Agents/Diseases. In *CDC website* (www.bt.cdc.gov).

- Celli, J., de Chastellier, C., Franchini, D.M., Pizarro-Cerda, J., Moreno, E., and Gorvel, J.P. (2003) Brucella evades macrophage killing via VirB-dependent sustained interactions with the endoplasmic reticulum. *J Exp Med* **198**: 545-556.
- Celli, J., and Gorvel, J.P. (2004) Organelle robbery: Brucella interactions with the endoplasmic reticulum. *Curr Opin Microbiol* **7**: 93-97.
- Celli, J., Salcedo, S.P., and Gorvel, J.P. (2005) Brucella coopts the small GTPase Sar1 for intracellular replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 1673-1678.
- Celli, J. (2006) Surviving inside a macrophage: the many ways of Brucella. *Res Microbiol* **157**: 93-98.
- CFSPH (2007) Brucellosis. In *The Center for Food Security & Public Health*.
- Chain, P.S., Comerchi, D.J., Tolmasky, M.E., Larimer, F.W., Malfatti, S.A., Vergez, L.M., Agüero, F., Land, M.L., Ugalde, R.A., and Garcia, E. (2005) Whole-genome analyses of speciation events in pathogenic Brucellae. *Infect Immun* **73**: 8353-8361.
- Charon, N.W., and Goldstein, S.F. (2002) Genetics of motility and chemotaxis of a fascinating group of bacteria: the spirochetes. *Annu Rev Genet* **36**: 47-73.
- Charon, N.W., Goldstein, S.F., Marko, M., Hsieh, C., Gebhardt, L.L., Motaleb, M.A., Wolgemuth, C.W., Limberger, R.J., and Rowe, N. (2009) The flat-ribbon configuration of the periplasmic flagella of *Borrelia burgdorferi* and its relationship to motility and morphology. *J Bacteriol* **191**: 600-607.
- Chevance, F.F., Takahashi, N., Karlinsey, J.E., Gnerer, J., Hirano, T., Samudrala, R., Aizawa, S., and Hughes, K.T. (2007) The mechanism of outer membrane penetration by the eubacterial flagellum and implications for spirochete evolution. *Genes Dev* **21**: 2326-2335.
- Chevance, F.F., and Hughes, K.T. (2008) Coordinating assembly of a bacterial macromolecular machine. *Nat Rev Microbiol* **6**: 455-465.
- Chilcott, G.S., and Hughes, K.T. (2000) Coupling of flagellar gene expression to flagellar assembly in *Salmonella enterica* serovar typhimurium and *Escherichia coli*. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**: 694-708.
- Childers, S.E., Ciufo, S., and Lovley, D.R. (2002) *Geobacter metallireducens* accesses insoluble Fe(III) oxide by chemotaxis. *Nature* **416**: 767-769.
- Chng, C.P., and Kitao, A. (2008) Thermal unfolding simulations of bacterial flagellin: insight into its refolding before assembly. *Biophys J* **94**: 3858-3871.
- Chou, A.Y., Archdeacon, J., and Kado, C.I. (1998) *Agrobacterium* transcriptional regulator Ros is a prokaryotic zinc finger protein that regulates the plant oncogene ipt. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 5293-5298.
- Cohen, N., Golik, A., Alon, I., Zaidenstein, R., Dishy, V., Karpuch, J., Zyssman, I., and Modai, D. (1997) Conservative treatment for Brucella endocarditis. *Clin Cardiol* **20**: 291-294.
- Cohen-Ben-Lulu, G.N., Francis, N.R., Shimon, E., Noy, D., Davidov, Y., Prasad, K., Sagi, Y., Cecchini, G., Johnstone, R.M., and Eisenbach, M. (2008) The bacterial flagellar switch complex is getting more complex. *Embo J* **27**: 1134-1144.
- Comerchi, D.J., Martinez-Lorenzo, M.J., Sieira, R., Gorvel, J.P., and Ugalde, R.A. (2001) Essential role of the VirB machinery in the maturation of the Brucella abortus-containing vacuole. *Cell Microbiol* **3**: 159-168.
- Commander, N.J., Spencer, S.A., Wren, B.W., and MacMillan, A.P. (2007) The identification of two protective DNA vaccines from a panel of five plasmid constructs encoding Brucella melitensis 16M genes. *Vaccine* **25**: 43-54.
- Corbel, M.J. (1997) Brucellosis: an overview. *Emerg Infect Dis* **3**: 213-221.
- Cornelis, G.R. (2006) The type III secretion injectisome. *Nat Rev Microbiol* **4**: 811-825.

- Daniels, R., Vanderleyden, J., and Michiels, J. (2004) Quorum sensing and swarming migration in bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **28**: 261-289.
- Dasgupta, N., Arora, S.K., and Ramphal, R. (2000) fleN, a gene that regulates flagellar number in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **182**: 357-364.
- Dasgupta, N., and Ramphal, R. (2001) Interaction of the antiactivator FleN with the transcriptional activator FleQ regulates flagellar number in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **183**: 6636-6644.
- Dasgupta, N., Wolfgang, M.C., Goodman, A.L., Arora, S.K., Jyot, J., Lory, S., and Ramphal, R. (2003) A four-tiered transcriptional regulatory circuit controls flagellar biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* **50**: 809-824.
- Dawson, C.E., Stubberfield, E.J., Perrett, L.L., King, A.C., Whatmore, A.M., Bashiruddin, J.B., Stack, J.A., and Macmillan, A.P. (2008) Phenotypic and molecular characterisation of *Brucella* isolates from marine mammals. *BMC Microbiol* **8**: 224.
- de Jong, M.F., Sun, Y.H., den Hartigh, A.B., van Dijk, J.M., and Tsolis, R.M. (2008) Identification of VceA and VceC, two members of the VjbR regulon that are translocated into macrophages by the *Brucella* type IV secretion system. *Mol Microbiol* **70**: 1378-1396.
- Deakin, W.J., Sanderson, J.L., Goswami, T., and Shaw, C.H. (1997) The *Agrobacterium tumefaciens* motor gene, *motA*, is in a linked cluster with the flagellar switch protein genes, *fliG*, *fliM* and *fliN*. *Gene* **189**: 139-141.
- Defrance, M., Janky, R., Sand, O., and van Helden, J. (2008) Using RSAT oligo-analysis and dyad-analysis tools to discover regulatory signals in nucleic sequences. *Nat Protoc* **3**: 1589-1603.
- Delory, M. (2006) caractérisation des facteurs sigma alternatifs de *Brucella melitensis* 16M. In *URBM Namur: FUNDP*.
- Delory, M., Hallez, R., Letesson, J.J., and De Bolle, X. (2006) An RpoH-like heat shock sigma factor is involved in stress response and virulence in *Brucella melitensis* 16M. *J Bacteriol* **188**: 7707-7710.
- Delpino, M.V., Fossati, C.A., and Baldi, P.C. (2004) Occurrence and potential diagnostic applications of serological cross-reactivities between *Brucella* and other alpha-proteobacteria. *Clin Diagn Lab Immunol* **11**: 868-873.
- Delrue, R.M., Martinez-Lorenzo, M., Lestrade, P., Danese, I., Bielarz, V., Mertens, P., De Bolle, X., Tibor, A., Gorvel, J.P., and Letesson, J.J. (2001) Identification of *Brucella* spp. genes involved in intracellular trafficking. *Cell Microbiol* **3**: 487-497.
- Delrue, R.M., Deschamps, C., Leonard, S., Nijskens, C., Danese, I., Schaus, J.M., Bonnot, S., Ferrooz, J., Tibor, A., De Bolle, X., and Letesson, J.J. (2005) A quorum-sensing regulator controls expression of both the type IV secretion system and the flagellar apparatus of *Brucella melitensis*. *Cell Microbiol* **7**: 1151-1161.
- DelVecchio, V.G., Kapatral, V., Elzer, P., Patra, G., and Mijer, C.V. (2002a) The genome of *Brucella melitensis*. *Vet Microbiol* **90**: 587-592.
- DelVecchio, V.G., Kapatral, V., Redkar, R.J., Patra, G., Mijer, C., Los, T., Ivanova, N., Anderson, I., Bhattacharyya, A., Lykidis, A., Reznik, G., Jablonski, L., Larsen, N., D'Souza, M., Bernal, A., Mazur, M., Goltsman, E., Selkov, E., Elzer, P.H., Hagius, S., O'Callaghan, D., Letesson, J.J., Haselkorn, R., Kyrpides, N., and Overbeek, R. (2002b) The genome sequence of the facultative intracellular pathogen *Brucella melitensis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 443-448.
- DeRosier, D. (2006) Bacterial flagellum: visualizing the complete machine in situ. *Curr Biol* **16**: R928-930.
- Dinarello, C.A. (1998) Interleukin-1 beta, interleukin-18, and the interleukin-1 beta converting enzyme. *Ann N Y Acad Sci* **856**: 1-11.

- Doig, P., and Trust, T.J. (1994) Identification of surface-exposed outer membrane antigens of *Helicobacter pylori*. *Infect Immun* **62**: 4526-4533.
- Doolittle, W.F., and Zhaxybayeva, O. (2007) Evolution: reducible complexity -- the case for bacterial flagella. *Curr Biol* **17**: R510-512.
- Douillard, F.P., Ryan, K.A., Caly, D.L., Hinds, J., Witney, A.A., Husain, S.E., and O'Toole, P.W. (2008) Posttranscriptional regulation of flagellin synthesis in *Helicobacter pylori* by the RpoN chaperone HP0958. *J Bacteriol* **190**: 7975-7984.
- Dozot, M., Boigegrain, R.A., Delrue, R.M., Hallez, R., Ouahrani-Bettache, S., Danese, I., Letesson, J.J., De Bolle, X., and Kohler, S. (2006) The stringent response mediator Rsh is required for *Brucella melitensis* and *Brucella suis* virulence, and for expression of the type IV secretion system virB. *Cell Microbiol* **8**: 1791-1802.
- Dricot, A., Rual, J.F., Lamesch, P., Bertin, N., Dupuy, D., Hao, T., Lambert, C., Hallez, R., Delroisse, J.M., Vandenhaute, J., Lopez-Goni, I., Moriyon, I., Garcia-Lobo, J.M., Sangari, F.J., Macmillan, A.P., Cutler, S.J., Whatmore, A.M., Bozak, S., Sequerra, R., Doucette-Stamm, L., Vidal, M., Hill, D.E., Letesson, J.J., and De Bolle, X. (2004) Generation of the *Brucella melitensis* ORFeome version 1.1. *Genome Res* **14**: 2201-2206.
- Dutton, R.J., Xu, Z., and Gober, J.W. (2005) Linking structural assembly to gene expression: a novel mechanism for regulating the activity of a sigma54 transcription factor. *Mol Microbiol* **58**: 743-757.
- Edwards, R.J., Sockett, R.E., and Brookfield, J.F. (2002) A simple method for genome-wide screening for advantageous insertions of mobile DNAs in *Escherichia coli*. *Curr Biol* **12**: 863-867.
- Eggenhofer, E., Rachel, R., Haslbeck, M., and Scharf, B. (2006) MotD of *Sinorhizobium meliloti* and related alpha-proteobacteria is the flagellar-hook-length regulator and therefore reassigned as FliK. *J Bacteriol* **188**: 2144-2153.
- Ely, B., Ely, T.W., Crymes, W.B., Jr., and Minnich, S.A. (2000) A family of six flagellin genes contributes to the *Caulobacter crescentus* flagellar filament. *J Bacteriol* **182**: 5001-5004.
- EMBL-EBI (2009) Code couleur de ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/help.html#alignment>).
- England, J.C., and Gober, J.W. (2001) Cell cycle control of cell morphogenesis in *Caulobacter*. *Curr Opin Microbiol* **4**: 674-680.
- Faguy, D.M., and Jarrell, K.F. (1999) A twisted tale: the origin and evolution of motility and chemotaxis in prokaryotes. *Microbiology* **145** (Pt 2): 279-281.
- Fan, F., and Macnab, R.M. (1996) Enzymatic characterization of FliI. An ATPase involved in flagellar assembly in *Salmonella typhimurium*. *J Biol Chem* **271**: 31981-31988.
- Ferooz, J. (2003) Contribution à l'étude de la régulation du système flagellaire chez *Brucella*. In *Faculté des sciences Namur: Faculté universitaires notre-dame de la paix* (FUNDP), pp. 61.
- Ferris, H.U., and Minamino, T. (2006) Flipping the switch: bringing order to flagellar assembly. *Trends Microbiol* **14**: 519-526.
- Feuillet, V., Medjane, S., Mondor, I., Demaria, O., Pagni, P.P., Galan, J.E., Flavell, R.A., and Alexopoulou, L. (2006) Involvement of Toll-like receptor 5 in the recognition of flagellated bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 12487-12492.
- Fink, S.L., and Cookson, B.T. (2005) Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infect Immun* **73**: 1907-1916.
- Francez-Charlot, A., Frunzke, J., Reichen, C., Ebner, J.Z., Gourion, B., and Vorholt, J.A. (2009) Sigma factor mimicry involved in regulation of general stress response. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 3467-3472.

- Franchi, L., Amer, A., Body-Malapel, M., Kanneganti, T.D., Ozoren, N., Jagirdar, R., Inohara, N., Vandenabeele, P., Bertin, J., Coyle, A., Grant, E.P., and Nunez, G. (2006) Cytosolic flagellin requires Ipaf for activation of caspase-1 and interleukin 1 beta in salmonella-infected macrophages. *Nat Immunol* **7**: 576-582.
- Franchi, L., Stoolman, J., Kanneganti, T.D., Verma, A., Ramphal, R., and Nunez, G. (2007) Critical role for Ipaf in *Pseudomonas aeruginosa*-induced caspase-1 activation. *Eur J Immunol* **37**: 3030-3039.
- Francis, N.R., Sosinsky, G.E., Thomas, D., and DeRosier, D.J. (1994) Isolation, characterization and structure of bacterial flagellar motors containing the switch complex. *J Mol Biol* **235**: 1261-1270.
- Fraser, G.M., Bennett, J.C., and Hughes, C. (1999) Substrate-specific binding of hook-associated proteins by FlgN and FliT, putative chaperones for flagellum assembly. *Mol Microbiol* **32**: 569-580.
- Fraser, G.M., and Hughes, C. (1999) Swarming motility. *Curr Opin Microbiol* **2**: 630-635.
- Fretin, D., Fauconnier, A., Kohler, S., Halling, S., Leonard, S., Nijskens, C., Ferooz, J., Lestrade, P., Delrue, R.M., Danese, I., Vandenhoute, J., Tibor, A., DeBolle, X., and Letesson, J.J. (2005) The sheathed flagellum of *Brucella melitensis* is involved in persistence in a murine model of infection. *Cell Microbiol* **7**: 687-698.
- Frisk, A., Jyot, J., Arora, S.K., and Ramphal, R. (2002) Identification and functional characterization of flgM, a gene encoding the anti-sigma 28 factor in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **184**: 1514-1521.
- Frye, J., Karlinsey, J.E., Felise, H.R., Marzolf, B., Dowidar, N., McClelland, M., and Hughes, K.T. (2006) Identification of new flagellar genes of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Bacteriol* **188**: 2233-2243.
- Fuerst, J.A. (1980) Bacterial sheathed flagella and the rotary motor model for the mechanism of bacterial motility. *J Theor Biol* **84**: 761-774.
- Fuerst, J.A., and Perry, J.W. (1988) Demonstration of lipopolysaccharide on sheathed flagella of *Vibrio cholerae* O:1 by protein A-gold immunoelectron microscopy. *J Bacteriol* **170**: 1488-1494.
- Fux, C.A., Shirtliff, M., Stoodley, P., and Costerton, J.W. (2005) Can laboratory reference strains mirror "real-world" pathogenesis? *Trends Microbiol* **13**: 58-63.
- Garin-Bastuji, B. (2000) Brucellose du porc domestique et du sanglier sauvage due à *Brucella suis* biovar 2 en France. *Epidémiol. et santé anim.* **38**: 1-5.
- Garrett, E.S., Perlegas, D., and Wozniak, D.J. (1999) Negative control of flagellum synthesis in *Pseudomonas aeruginosa* is modulated by the alternative sigma factor AlgT (AlgU). *J Bacteriol* **181**: 7401-7404.
- Ge, Y., and Charon, N.W. (1997a) Identification of a large motility operon in *Borrelia burgdorferi* by semi-random PCR chromosome walking. *Gene* **189**: 195-201.
- Ge, Y., and Charon, N.W. (1997b) An unexpected flaA homolog is present and expressed in *Borrelia burgdorferi*. *J Bacteriol* **179**: 552-556.
- Ge, Y., Old, I.G., Girons, I.S., and Charon, N.W. (1997a) The flgK motility operon of *Borrelia burgdorferi* is initiated by a sigma 70-like promoter. *Microbiology* **143** (Pt 5): 1681-1690.
- Ge, Y., Old, I.G., Saint Girons, I., and Charon, N.W. (1997b) Molecular characterization of a large *Borrelia burgdorferi* motility operon which is initiated by a consensus sigma70 promoter. *J Bacteriol* **179**: 2289-2299.
- Geis, G., Suerbaum, S., Forsthoff, B., Lying, H., and Opferkuch, W. (1993) Ultrastructure and biochemical studies of the flagellar sheath of *Helicobacter pylori*. *J Med Microbiol* **38**: 371-377.

- Gewirtz, A.T., Yu, Y., Krishna, U.S., Israel, D.A., Lyons, S.L., and Peek, R.M., Jr. (2004) *Helicobacter pylori* flagellin evades toll-like receptor 5-mediated innate immunity. *J Infect Dis* **189**: 1914-1920.
- Ghelardi, E., Celandroni, F., Salvetti, S., Beecher, D.J., Gominet, M., Lereclus, D., Wong, A.C., and Senesi, S. (2002) Requirement of *flhA* for swarming differentiation, flagellin export, and secretion of virulence-associated proteins in *Bacillus thuringiensis*. *J Bacteriol* **184**: 6424-6433.
- Godfroid, J. (2002) Brucellosis in wildlife. *Rev Sci Tech* **21**: 277-286.
- Godfroid, J., Cloeckert, A., Liautard, J.P., Kohler, S., Fretin, D., Walravens, K., Garin-Bastuji, B., and Letesson, J.J. (2005) From the discovery of the Malta fever's agent to the discovery of a marine mammal reservoir, brucellosis has continuously been a re-emerging zoonosis. *Vet Res* **36**: 313-326.
- Gomez-Gomez, L., and Boller, T. (2002) Flagellin perception: a paradigm for innate immunity. *Trends Plant Sci* **7**: 251-256.
- Gonzalez-Pedrajo, B., Minamino, T., Kihara, M., and Namba, K. (2006) Interactions between C ring proteins and export apparatus components: a possible mechanism for facilitating type III protein export. *Mol Microbiol* **60**: 984-998.
- Goodier, R.I., and Ahmer, B.M. (2001) SirA orthologs affect both motility and virulence. *J Bacteriol* **183**: 2249-2258.
- Goodman, S.D., Velten, N.J., Gao, Q., Robinson, S., and Segall, A.M. (1999) In vitro selection of integration host factor binding sites. *J Bacteriol* **181**: 3246-3255.
- Goon, S., Kelly, J.F., Logan, S.M., Ewing, C.P., and Guerry, P. (2003) Pseudaminic acid, the major modification on *Campylobacter* flagellin, is synthesized via the Cj1293 gene. *Mol Microbiol* **50**: 659-671.
- Gophna, U., Ron, E.Z., and Graur, D. (2003) Bacterial type III secretion systems are ancient and evolved by multiple horizontal-transfer events. *Gene* **312**: 151-163.
- Gorvel, J.P. (2008) Brucella: a Mr "Hide" converted into Dr Jekyll. *Microbes Infect* **10**: 1010-1013.
- Gourion, B., Rossignol, M., and Vorholt, J.A. (2006) A proteomic study of *Methylobacterium extorquens* reveals a response regulator essential for epiphytic growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 13186-13191.
- Gourion, B., Francez-Charlot, A., and Vorholt, J.A. (2008) PhyR is involved in the general stress response of *Methylobacterium extorquens* AM1. *J Bacteriol* **190**: 1027-1035.
- Grundling, A., Burrack, L.S., Bouwer, H.G., and Higgins, D.E. (2004) *Listeria monocytogenes* regulates flagellar motility gene expression through MogR, a transcriptional repressor required for virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 12318-12323.
- Grunenfelder, B., Gehrig, S., and Jenal, U. (2003) Role of the cytoplasmic C terminus of the FliF motor protein in flagellar assembly and rotation. *J Bacteriol* **185**: 1624-1633.
- Grunenfelder, B., Tawfilis, S., Gehrig, S., M, O.S., Eglin, D., and Jenal, U. (2004) Identification of the Protease and the Turnover Signal Responsible for Cell Cycle-Dependent Degradation of the *Caulobacter* FliF Motor Protein. *J Bacteriol* **186**: 4960-4971.
- Gryllos, I., Shaw, J.G., Gavin, R., Merino, S., and Tomas, J.M. (2001) Role of *flm* locus in mesophilic *Aeromonas* species adherence. *Infect Immun* **69**: 65-74.
- Guerra, H. (2007) The brucellae and their success as pathogens. *Crit Rev Microbiol* **33**: 325-331.
- Guerry, P. (2007) *Campylobacter* flagella: not just for motility. *Trends Microbiol* **15**: 456-461.

- Guerry, P., and Szymanski, C.M. (2008) Campylobacter sugars sticking out. *Trends Microbiol* **16**: 428-435.
- Hakomori, S. (2002) Glycosylation defining cancer malignancy: new wine in an old bottle. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 10231-10233.
- Hallez, R., Bellefontaine, A.F., Letesson, J.J., and De Bolle, X. (2004) Morphological and functional asymmetry in alpha-proteobacteria. *Trends Microbiol* **12**: 361-365.
- Hallez, R., Letesson, J.J., Vandenhoute, J., and De Bolle, X. (2007a) Gateway-based destination vectors for functional analyses of bacterial ORFeomes: application to the Min system in *Brucella abortus*. *Appl Environ Microbiol* **73**: 1375-1379.
- Hallez, R., Mignolet, J., Van Mullem, V., Wery, M., Vandenhoute, J., Letesson, J.J., Jacobs-Wagner, C., and De Bolle, X. (2007b) The asymmetric distribution of the essential histidine kinase PdhS indicates a differentiation event in *Brucella abortus*. *Embo J* **26**: 1444-1455.
- Halling, S.M. (1998) On the presence and organization of open reading frames of the nonmotile pathogen *Brucella abortus* similar to class II, III, and IV flagellar genes and to LcrD virulence superfamily. *Microb Comp Genomics* **3**: 21-29.
- Harley, C.B., and Reynolds, R.P. (1987) Analysis of *E. coli* promoter sequences. *Nucleic Acids Res* **15**: 2343-2361.
- Harshey, R.M. (2003) Bacterial motility on a surface: many ways to a common goal. *Annu Rev Microbiol* **57**: 249-273.
- Hayashi, F., Smith, K.D., Ozinsky, A., Hawn, T.R., Yi, E.C., Goodlett, D.R., Eng, J.K., Akira, S., Underhill, D.M., and Adere, A. (2001) The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* **410**: 1099-1103.
- Hellweg, C., Puhler, A., and Weidner, S. (2009) The time course of the transcriptomic response of *Sinorhizobium meliloti* 1021 following a shift to acidic pH. *BMC Microbiol* **9**: 37.
- Helmann, J.D. (2002) The extracytoplasmic function (ECF) sigma factors. *Adv Microb Physiol* **46**: 47-110.
- Helmann, J.D. (2006) Deciphering a complex genetic regulatory network: the *Bacillus subtilis* sigmaW protein and intrinsic resistance to antimicrobial compounds. *Sci Prog* **89**: 243-266.
- Hendrixson, D.R., and DiRita, V.J. (2003) Transcription of sigma54-dependent but not sigma28-dependent flagellar genes in *Campylobacter jejuni* is associated with formation of the flagellar secretory apparatus. *Mol Microbiol* **50**: 687-702.
- Hense, B.A., Kuttler, C., Muller, J., Rothballer, M., Hartmann, A., and Kreft, J.U. (2007) Does efficiency sensing unify diffusion and quorum sensing? *Nat Rev Microbiol* **5**: 230-239.
- Heuner, K., and Steinert, M. (2003) The flagellum of *Legionella pneumophila* and its link to the expression of the virulent phenotype. *Int J Med Microbiol* **293**: 133-143.
- Hirano, T., Yamaguchi, S., Oosawa, K., and Aizawa, S. (1994) Roles of FlhK and FlhB in determination of flagellar hook length in *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **176**: 5439-5449.
- Hirano, T., Minamino, T., and Macnab, R.M. (2001) The role in flagellar rod assembly of the N-terminal domain of *Salmonella* FlgJ, a flagellum-specific muramidase. *J Mol Biol* **312**: 359-369.
- Hirano, T., Shibata, S., Ohnishi, K., Tani, T., and Aizawa, S. (2005) N-terminal signal region of FlhK is dispensable for length control of the flagellar hook. *Mol Microbiol* **56**: 346-360.

- Hizukuri, Y., Yakushi, T., Kawagishi, I., and Homma, M. (2006) Role of the intramolecular disulfide bond in FlgI, the flagellar P-ring component of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **188**: 4190-4197.
- Hizukuri, Y., Kojima, S., Yakushi, T., Kawagishi, I., and Homma, M. (2008) Systematic Cys mutagenesis of FlgI, the flagellar P-ring component of *Escherichia coli*. *Microbiology* **154**: 810-817.
- Hoang, H.H., Gurich, N., and Gonzalez, J.E. (2008) Regulation of motility by the ExpR/Sin quorum-sensing system in *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* **190**: 861-871.
- Homma, M., and Iino, T. (1985) Locations of hook-associated proteins in flagellar structures of *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **162**: 183-189.
- Homma, M., Kutsukake, K., Hasebe, M., Iino, T., and Macnab, R.M. (1990) FlgB, FlgC, FlgF and FlgG. A family of structurally related proteins in the flagellar basal body of *Salmonella typhimurium*. *J Mol Biol* **211**: 465-477.
- Honko, A.N., and Mizel, S.B. (2005) Effects of flagellin on innate and adaptive immunity. *Immunol Res* **33**: 83-101.
- Howard, S.L., Jagannathan, A., Soo, E.C., Hui, J.P., Aubry, A.J., Ahmed, I., Karlyshev, A., Kelly, J.F., Jones, M.A., Stevens, M.P., Logan, S.M., and Wren, B.W. (2009) *Campylobacter jejuni* glycosylation island important in cell charge, legionaminic acid biosynthesis, and colonization of chickens. *Infect Immun* **77**: 2544-2556.
- Hranitzky, K.W., Mulholland, A., Larson, A.D., Eubanks, E.R., and Hart, L.T. (1980) Characterization of a flagellar sheath protein of *Vibrio cholerae*. *Infect Immun* **27**: 597-603.
- Huerta, A.M., Francino, M.P., Morett, E., and Collado-Vides, J. (2006) Selection for unequal densities of sigma70 promoter-like signals in different regions of large bacterial genomes. *PLoS Genet* **2**: e185.
- Hughes, K.T., and Mathee, K. (1998) The anti-sigma factors. *Annu Rev Microbiol* **52**: 231-286.
- Imada, K., Minamino, T., Tahara, A., and Namba, K. (2007) Structural similarity between the flagellar type III ATPase FliI and F1-ATPase subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 485-490.
- ISP (2007) Brucella. http://www.iph.fgov.be/epidemio/epifr/plabfr/plabanfr/07_bruf_r.pdf.
- Jacobi, S., Schade, R., and Heuner, K. (2004) Characterization of the alternative sigma factor sigma54 and the transcriptional regulator FleQ of *Legionella pneumophila*, which are both involved in the regulation cascade of flagellar gene expression. *J Bacteriol* **186**: 2540-2547.
- Jacobs, F., Abramowicz, D., Vereerstraeten, P., Le Clerc, J.L., Zech, F., and Thys, J.P. (1990) *Brucella endocarditis*: the role of combined medical and surgical treatment. *Rev Infect Dis* **12**: 740-744.
- Jarrell, K.F., and McBride, M.J. (2008) The surprisingly diverse ways that prokaryotes move. *Nat Rev Microbiol* **6**: 466-476.
- Jenal, U. (2000) Signal transduction mechanisms in *Caulobacter crescentus* development and cell cycle control. *FEMS Microbiol Rev* **24**: 177-191.
- Jones, A.C., Logan, R.P., Foynes, S., Cockayne, A., Wren, B.W., and Penn, C.W. (1997) A flagellar sheath protein of *Helicobacter pylori* is identical to HpaA, a putative N-acetylneuraminylactose-binding hemagglutinin, but is not an adhesin for AGS cells. *J Bacteriol* **179**: 5643-5647.
- Josenhans, C., Labigne, A., and Suerbaum, S. (1995) Comparative ultrastructural and functional studies of *Helicobacter pylori* and *Helicobacter mustelae* flagellin mutants: both flagellin subunits, FlaA and FlaB, are necessary for full motility in *Helicobacter* species. *J Bacteriol* **177**: 3010-3020.

- Josenhans, C., and Suerbaum, S. (2002) The role of motility as a virulence factor in bacteria. *Int J Med Microbiol* **291**: 605-614.
- Josenhans, C., Vossebein, L., Friedrich, S., and Suerbaum, S. (2002) The neuA/flmD gene cluster of *Helicobacter pylori* is involved in flagellar biosynthesis and flagellin glycosylation. *FEMS Microbiol Lett* **210**: 165-172.
- Joslin, S.N., and Hendrixson, D.R. (2008) Analysis of the *Campylobacter jejuni* FlgR response regulator suggests integration of diverse mechanisms to activate an NtrC-like protein. *J Bacteriol* **190**: 2422-2433.
- Journet, L., Agrain, C., Broz, P., and Cornelis, G.R. (2003) The needle length of bacterial injectisomes is determined by a molecular ruler. *Science* **302**: 1757-1760.
- Jyot, J., Dasgupta, N., and Ramphal, R. (2002) FleQ, the major flagellar gene regulator in *Pseudomonas aeruginosa*, binds to enhancer sites located either upstream or atypically downstream of the RpoN binding site. *J Bacteriol* **184**: 5251-5260.
- Kalir, S., McClure, J., Pabbaraju, K., Southward, C., Ronen, M., Leibler, S., Surette, M.G., and Alon, U. (2001) Ordering genes in a flagella pathway by analysis of expression kinetics from living bacteria. *Science* **292**: 2080-2083.
- Kamal, N., Dorrell, N., Jagannathan, A., Turner, S.M., Constantinidou, C., Studholme, D.J., Marsden, G., Hinds, J., Laing, K.G., Wren, B.W., and Penn, C.W. (2007) Deletion of a previously uncharacterized flagellar-hook-length control gene *fliK* modulates the sigma54-dependent regulon in *Campylobacter jejuni*. *Microbiology* **153**: 3099-3111.
- Kanbe, M., Shibata, S., Umino, Y., Jenal, U., and Aizawa, S.I. (2005) Protease susceptibility of the *Caulobacter crescentus* flagellar hook-basal body: a possible mechanism of flagellar ejection during cell differentiation. *Microbiology* **151**: 433-438.
- Kanbe, M., Yagasaki, J., Zehner, S., Gottfert, M., and Aizawa, S. (2007) Characterization of two sets of subpolar flagella in *Bradyrhizobium japonicum*. *J Bacteriol* **189**: 1083-1089.
- Kanehisa, M., Goto, S., Kawashima, S., Okuno, Y., and Hattori, M. (2004) The KEGG resource for deciphering the genome. *Nucleic Acids Res* **32**: D277-280.
- Karlberg, E.O., and Andersson, S.G. (2003) Mitochondrial gene history and mRNA localization: is there a correlation? *Nat Rev Genet* **4**: 391-397.
- Karlinsey, J.E., Tanaka, S., Bettenworth, V., Yamaguchi, S., Boos, W., Aizawa, S.I., and Hughes, K.T. (2000) Completion of the hook-basal body complex of the *Salmonella typhimurium* flagellum is coupled to FlgM secretion and *fliC* transcription. *Mol Microbiol* **37**: 1220-1231.
- KEGG (2009) KEGG PATHWAY: Flagellar assembly - *Brucella melitensis* 16M.
- Kennis, J.T., and Crosson, S. (2007) Microbiology. A bacterial pathogen sees the light. *Science* **317**: 1041-1042.
- Kentner, D., and Sourjik, V. (2006) Spatial organization of the bacterial chemotaxis system. *Curr Opin Microbiol* **9**: 619-624.
- Khan, S., Pierce, D., and Vale, R.D. (2000) Interactions of the chemotaxis signal protein CheY with bacterial flagellar motors visualized by evanescent wave microscopy. *Curr Biol* **10**: 927-930.
- Kihara, M., Minamino, T., Yamaguchi, S., and Macnab, R.M. (2001) Intergenic suppression between the flagellar MS ring protein FliF of *Salmonella* and FlhA, a membrane component of its export apparatus. *J Bacteriol* **183**: 1655-1662.
- Kim, T.J., Young, B.M., and Young, G.M. (2008) Effect of flagellar mutations on *Yersinia enterocolitica* biofilm formation. *Appl Environ Microbiol* **74**: 5466-5474.
- Kim, Y.K., and McCarter, L.L. (2004) Cross-Regulation in *Vibrio parahaemolyticus*: Compensatory Activation of Polar Flagellar Genes by the Lateral Flagellar Regulator LafK. *J Bacteriol* **186**: 4014-4018.

- Kirov, S.M. (2003) Bacteria that express lateral flagella enable dissection of the multifunctional roles of flagella in pathogenesis. *FEMS Microbiol Lett* **224**: 151-159.
- Klose, K.E., and Mekalanos, J.J. (1998) Distinct roles of an alternative sigma factor during both free-swimming and colonizing phases of the *Vibrio cholerae* pathogenic cycle. *Mol Microbiol* **28**: 501-520.
- Ko, J., and Splitter, G.A. (2003) Molecular host-pathogen interaction in brucellosis: current understanding and future approaches to vaccine development for mice and humans. *Clin Microbiol Rev* **16**: 65-78.
- Kodaka, H., Armfield, A.Y., Lombard, G.L., and Dowell, V.R., Jr. (1982) Practical procedure for demonstrating bacterial flagella. *J Clin Microbiol* **16**: 948-952.
- Kohler, S., Foulongne, V., Ouahrani-Bettache, S., Bourg, G., Teyssier, J., Ramuz, M., and Liautard, J.P. (2002a) The analysis of the intramacrophagic virulome of *Brucella suis* deciphers the environment encountered by the pathogen inside the macrophage host cell. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 15711-15716.
- Kohler, S., Porte, F., Jubier-Maurin, V., Ouahrani-Bettache, S., Teyssier, J., and Liautard, J.P. (2002b) The intramacrophagic environment of *Brucella suis* and bacterial response. *Vet Microbiol* **90**: 299-309.
- Kohler, S., Michaux-Charachon, S., Porte, F., Ramuz, M., and Liautard, J.P. (2003) What is the nature of the replicative niche of a stealthy bug named *Brucella*? *Trends Microbiol* **11**: 215-219.
- Kojima, S., and Blair, D.F. (2001) Conformational change in the stator of the bacterial flagellar motor. *Biochemistry* **40**: 13041-13050.
- Kojima, S., and Blair, D.F. (2004) Solubilization and purification of the MotA/MotB complex of *Escherichia coli*. *Biochemistry* **43**: 26-34.
- Konkel, M.E., Klena, J.D., Rivera-Amill, V., Monteville, M.R., Biswas, D., Raphael, B., and Mickelson, J. (2004) Secretion of virulence proteins from *Campylobacter jejuni* is dependent on a functional flagellar export apparatus. *J Bacteriol* **186**: 3296-3303.
- Krukonis, E.S., and DiRita, V.J. (2003a) From motility to virulence: Sensing and responding to environmental signals in *Vibrio cholerae*. *Curr Opin Microbiol* **6**: 186-190.
- Krukonis, E.S., and DiRita, V.J. (2003b) DNA binding and ToxR responsiveness by the wing domain of TcpP, an activator of virulence gene expression in *Vibrio cholerae*. *Mol Cell* **12**: 157-165.
- Kubori, T., Shimamoto, N., Yamaguchi, S., Namba, K., and Aizawa, S. (1992) Morphological pathway of flagellar assembly in *Salmonella typhimurium*. *J Mol Biol* **226**: 433-446.
- Kutsukake, K., Ohya, Y., and Iino, T. (1990) Transcriptional analysis of the flagellar regulon of *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **172**: 741-747.
- Kutsukake, K. (1997) Autogenous and global control of the flagellar master operon, *flhD*, in *Salmonella typhimurium*. *Mol Gen Genet* **254**: 440-448.
- Kutsukake, K., Ikebe, T., and Yamamoto, S. (1999) Two novel regulatory genes, *fliT* and *fliZ*, in the flagellar regulon of *Salmonella*. *Genes Genet Syst* **74**: 287-292.
- Lambert, C., Evans, K.J., Till, R., Hobley, L., Capeness, M., Rendulic, S., Schuster, S.C., Aizawa, S., and Sockett, R.E. (2006) Characterizing the flagellar filament and the role of motility in bacterial prey-penetration by *Bdellovibrio bacteriovorus*. *Mol Microbiol* **60**: 274-286.
- Landini, P., and Zehnder, A.J. (2002) The global regulatory *hns* gene negatively affects adhesion to solid surfaces by anaerobically grown *Escherichia coli* by modulating expression of flagellar genes and lipopolysaccharide production. *J Bacteriol* **184**: 1522-1529.

- Lanois, A., Jubelin, G., and Givaudan, A. (2008) FliZ, a flagellar regulator, is at the crossroads between motility, haemolysin expression and virulence in the insect pathogenic bacterium *Xenorhabdus*. *Mol Microbiol* **68**: 516-533.
- Laub, M.T., McAdams, H.H., Feldblyum, T., Fraser, C.M., and Shapiro, L. (2000) Global analysis of the genetic network controlling a bacterial cell cycle. *Science* **290**: 2144-2148.
- Laub, M.T., Chen, S.L., Shapiro, L., and McAdams, H.H. (2002) Genes directly controlled by CtrA, a master regulator of the *Caulobacter* cell cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 4632-4637.
- Leclerc, G., Wang, S.P., and Ely, B. (1998) A new class of *Caulobacter crescentus* flagellar genes. *J Bacteriol* **180**: 5010-5019.
- Lee, S.H., and Galan, J.E. (2004) Salmonella type III secretion-associated chaperones confer secretion-pathway specificity. *Mol Microbiol* **51**: 483-495.
- Leonard, S., Ferroz, J., Haine, V., Danese, I., Fretin, D., Tibor, A., de Walque, S., De Bolle, X., and Letesson, J.J. (2007) FtcR is a new master regulator of the flagellar system of *Brucella melitensis* 16M with homologs in Rhizobiaceae. *J Bacteriol* **189**: 131-141.
- Léonard, S. (2005) Contribution à l'étude de la régulation de la cascade flagellaire chez *Brucella melitensis* 16M. In *URBM Namur: FUNDP*, pp. 199.
- Lestrade, P., Dricot, A., Delrue, R.M., Lambert, C., Martinelli, V., De Bolle, X., Letesson, J.J., and Tibor, A. (2003) Attenuated signature-tagged mutagenesis mutants of *Brucella melitensis* identified during the acute phase of infection in mice. *Infect Immun* **71**: 7053-7060.
- Letesson, J.J., Lestrade, P., Delrue, R.M., Danese, I., Bellefontaine, F., Fretin, D., Taminiau, B., Tibor, A., Dricot, A., Deschamps, C., Haine, V., Leonard, S., Laurent, T., Mertens, P., Vandenhoute, J., and De Bolle, X. (2002) Fun stories about *Brucella*: the "furtive nasty bug". *Vet Microbiol* **90**: 317-328.
- Li, C., Motaleb, A., Sal, M., Goldstein, S.F., and Charon, N.W. (2000) Spirochete periplasmic flagella and motility. *J Mol Microbiol Biotechnol* **2**: 345-354.
- Li, X., Lin, H., Zhang, W., Zou, Y., Zhang, J., Tang, X., and Zhou, J.M. (2005) Flagellin induces innate immunity in nonhost interactions that is suppressed by *Pseudomonas syringae* effectors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 12990-12995.
- Lightfield, K.L., Persson, J., Brubaker, S.W., Witte, C.E., von Moltke, J., Dunipace, E.A., Henry, T., Sun, Y.H., Cado, D., Dietrich, W.F., Monack, D.M., Tsolis, R.M., and Vance, R.E. (2008) Critical function for Naip5 in inflammasome activation by a conserved carboxy-terminal domain of flagellin. *Nat Immunol* **9**: 1171-1178.
- Liu, R., and Ochman, H. (2007a) Origins of flagellar gene operons and secondary flagellar systems. *J Bacteriol* **189**: 7098-7104.
- Liu, R., and Ochman, H. (2007b) Stepwise formation of the bacterial flagellar system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 7116-7121.
- Liu, X., and Matsumura, P. (1995) An alternative sigma factor controls transcription of flagellar class-III operons in *Escherichia coli*: gene sequence, overproduction, purification and characterization. *Gene* **164**: 81-84.
- Llewellyn, M., Dutton, R.J., Easter, J., O'Donnol, D., and Gober, J.W. (2005) The conserved flaF gene has a critical role in coupling flagellin translation and assembly in *Caulobacter crescentus*. *Mol Microbiol* **57**: 1127-1142.
- Logan, S.M., Kelly, J.F., Thibault, P., Ewing, C.P., and Guerry, P. (2002) Structural heterogeneity of carbohydrate modifications affects serospecificity of *Campylobacter* flagellins. *Mol Microbiol* **46**: 587-597.
- Logan, S.M. (2006) Flagellar glycosylation - a new component of the motility repertoire? *Microbiology* **152**: 1249-1262.

- Longstaff, D.G., Blight, S.K., Zhang, L., Green-Church, K.B., and Krzycki, J.A. (2007a) In vivo contextual requirements for UAG translation as pyrrolysine. *Mol Microbiol* **63**: 229-241.
- Longstaff, D.G., Larue, R.C., Faust, J.E., Mahapatra, A., Zhang, L., Green-Church, K.B., and Krzycki, J.A. (2007b) A natural genetic code expansion cassette enables transmissible biosynthesis and genetic encoding of pyrrolysine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 1021-1026.
- Lucero, N.E., Jacob, N.O., Ayala, S.M., Escobar, G.I., Tuccillo, P., and Jacques, I. (2005) Unusual clinical presentation of brucellosis caused by *Brucella canis*. *J Med Microbiol* **54**: 505-508.
- Lux, R., Kar, N., and Khan, S. (2000) Overproduced *Salmonella typhimurium* flagellar motor switch complexes. *J Mol Biol* **298**: 577-583.
- MacLellan, S.R., MacLean, A.M., and Finan, T.M. (2006) Promoter prediction in the rhizobia. *Microbiology* **152**: 1751-1763.
- Macnab, R.M. (1996) *Flagella and motility. In Escherichia coli and Salmonella*. Washington: ASM Press.
- Macnab, R.M. (2003) How Bacteria Assemble Flagella. *Annu Rev Microbiol*.
- Macnab, R.M. (2004) Type III flagellar protein export and flagellar assembly. *Biochim Biophys Acta* **1694**: 207-217.
- Maezawa, K., Shigenobu, S., Taniguchi, H., Kubo, T., Aizawa, S., and Morioka, M. (2006) Hundreds of flagellar basal bodies cover the cell surface of the endosymbiotic bacterium *Buchnera aphidicola* sp. strain APS. *J Bacteriol* **188**: 6539-6543.
- Makino, K., Oshima, K., Kurokawa, K., Yokoyama, K., Uda, T., Tagomori, K., Iijima, Y., Najima, M., Nakano, M., Yamashita, A., Kubota, Y., Kimura, S., Yasunaga, T., Honda, T., Shinagawa, H., Hattori, M., and Iida, T. (2003) Genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus*: a pathogenic mechanism distinct from that of *V. cholerae*. *Lancet* **361**: 743-749.
- Makishima, S., Komoriya, K., Yamaguchi, S., and Aizawa, S.I. (2001) Length of the flagellar hook and the capacity of the type III export apparatus. *Science* **291**: 2411-2413.
- Maki-Yonekura, S., Yonekura, K., and Namba, K. (2003) Domain movements of HAP2 in the cap-filament complex formation and growth process of the bacterial flagellum. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 15528-15533.
- Mangan, E.K., Malakooti, J., Caballero, A., Anderson, P., Ely, B., and Gober, J.W. (1999) FlbT couples flagellum assembly to gene expression in *Caulobacter crescentus*. *J Bacteriol* **181**: 6160-6170.
- Mariathasan, S., Newton, K., Monack, D.M., Vucic, D., French, D.M., Lee, W.P., Roose-Girma, M., Erickson, S., and Dixit, V.M. (2004) Differential activation of the inflammasome by caspase-1 adaptors ASC and Ipaf. *Nature* **430**: 213-218.
- Mariathasan, S., and Monack, D.M. (2007) Inflammasome adaptors and sensors: intracellular regulators of infection and inflammation. *Nat Rev Immunol* **7**: 31-40.
- Marth, J.D., and Grewal, P.K. (2008) Mammalian glycosylation in immunity. *Nat Rev Immunol* **8**: 874-887.
- Martinon, F., Gaide, O., Petrilli, V., Mayor, A., and Tschopp, J. (2007) NALP inflammasomes: a central role in innate immunity. *Semin Immunopathol* **29**: 213-229.
- Martz (2004) *The Bacterial Flagellar Hook: A Molecular Universal Joint*. Vol. 2004.
- Mascher, T., Helmann, J.D., and Uden, G. (2006) Stimulus perception in bacterial signal-transducing histidine kinases. *Microbiol Mol Biol Rev* **70**: 910-938.
- Mathews, M.A., Tang, H.L., and Blair, D.F. (1998) Domain analysis of the FlhM protein of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **180**: 5580-5590.
- Maurin, M. (2005) [Brucellosis at the dawn of the 21st century]. *Med Mal Infect* **35**: 6-16.

- McAdams, H.H., and Shapiro, L. (2003) A bacterial cell-cycle regulatory network operating in time and space. *Science* **301**: 1874-1877.
- McAdams, H.H., Srinivasan, B., and Arkin, A.P. (2004) The evolution of genetic regulatory systems in bacteria. *Nat Rev Genet* **5**: 169-178.
- McCarter, L.L. (1995) Genetic and molecular characterization of the polar flagellum of *Vibrio parahaemolyticus*. *J Bacteriol* **177**: 1595-1609.
- McCarter, L.L. (2001) Polar flagellar motility of the Vibrionaceae. *Microbiol Mol Biol Rev* **65**: 445-462, table of contents.
- McCarter, L.L. (2006) Regulation of flagella. *Curr Opin Microbiol* **9**: 180-186.
- McEvoy, M.M., Bren, A., Eisenbach, M., and Dahlquist, F.W. (1999) Identification of the binding interfaces on CheY for two of its targets, the phosphatase CheZ and the flagellar switch protein fliM. *J Mol Biol* **289**: 1423-1433.
- McMurry, J.L., Murphy, J.W., and Gonzalez-Pedrajo, B. (2006) The FliN-FliH interaction mediates localization of flagellar export ATPase FliI to the C ring complex. *Biochemistry* **45**: 11790-11798.
- McNally, D.J., Hui, J.P., Aubry, A.J., Mui, K.K., Guerry, P., Brisson, J.R., Logan, S.M., and Soo, E.C. (2006) Functional characterization of the flagellar glycosylation locus in *Campylobacter jejuni* 81-176 using a focused metabolomics approach. *J Biol Chem* **281**: 18489-18498.
- McNally, D.J., Aubry, A.J., Hui, J.P., Khieu, N.H., Whitfield, D., Ewing, C.P., Guerry, P., Brisson, J.R., Logan, S.M., and Soo, E.C. (2007) Targeted metabolomics analysis of *Campylobacter coli* VC167 reveals legionaminic acid derivatives as novel flagellar glycans. *J Biol Chem* **282**: 14463-14475.
- Menard, R., Sansonetti, P.J., and Parsot, C. (1993) Nonpolar mutagenesis of the ipa genes defines IpaB, IpaC, and IpaD as effectors of *Shigella flexneri* entry into epithelial cells. *J Bacteriol* **175**: 5899-5906.
- Merino, S., Shaw, J.G., and Tomas, J.M. (2006) Bacterial lateral flagella: an inducible flagella system. *FEMS Microbiol Lett* **263**: 127-135.
- Merkx-Jacques, A., Obhi, R.K., Bethune, G., and Creuzenet, C. (2004) The *Helicobacter pylori* flaA1 and wbpB genes control lipopolysaccharide and flagellum synthesis and function. *J Bacteriol* **186**: 2253-2265.
- Mesner, O., Riesenberger, K., Biliar, N., Borstein, E., Bouhnik, L., Peled, N., and Yagupsky, P. (2007) The many faces of human-to-human transmission of brucellosis: congenital infection and outbreak of nosocomial disease related to an unrecognized clinical case. *Clin Infect Dis* **45**: e135-140.
- Messner, P. (2004) Prokaryotic glycoproteins: unexplored but important. *J Bacteriol* **186**: 2517-2519.
- Miao, E.A., Alpuche-Aranda, C.M., Dors, M., Clark, A.E., Bader, M.W., Miller, S.I., and Aderem, A. (2006) Cytoplasmic flagellin activates caspase-1 and secretion of interleukin 1 β via Ipaf. *Nat Immunol* **7**: 569-575.
- Miao, E.A., Andersen-Nissen, E., Warren, S.E., and Aderem, A. (2007) TLR5 and Ipaf: dual sensors of bacterial flagellin in the innate immune system. *Semin Immunopathol* **29**: 275-288.
- Miao, E.A., Ernst, R.K., Dors, M., Mao, D.P., and Aderem, A. (2008) *Pseudomonas aeruginosa* activates caspase 1 through Ipaf. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 2562-2567.
- Michaux-Charachon, S., Foulongne, V., O'Callaghan, D., and Ramuz, M. (2002) [Brucella at the dawn of the third milenium: genomic organization and pathogenesis]. *Pathol Biol (Paris)* **50**: 401-412.
- Miller, J.H. (1972) *Assay of beta-galactosidase*. New York: Cold Spring Harbor, N.Y.

- Millikan, D.S., and Ruby, E.G. (2003) FlrA, a sigma54-dependent transcriptional activator in *Vibrio fischeri*, is required for motility and symbiotic light-organ colonization. *J Bacteriol* **185**: 3547-3557.
- Millikan, D.S., and Ruby, E.G. (2004) *Vibrio fischeri* flagellin A is essential for normal motility and for symbiotic competence during initial squid light organ colonization. *J Bacteriol* **186**: 4315-4325.
- Minamino, T., Chu, R., Yamaguchi, S., and Macnab, R.M. (2000a) Role of FliJ in flagellar protein export in *Salmonella*. *J Bacteriol* **182**: 4207-4215.
- Minamino, T., and MacNab, R.M. (2000) Interactions among components of the *Salmonella* flagellar export apparatus and its substrates. *Mol Microbiol* **35**: 1052-1064.
- Minamino, T., Yamaguchi, S., and Macnab, R.M. (2000b) Interaction between FliE and FlgB, a proximal rod component of the flagellar basal body of *Salmonella*. *J Bacteriol* **182**: 3029-3036.
- Minamino, T., Gonzalez-Pedrajo, B., Oosawa, K., Namba, K., and Macnab, R.M. (2002) Structural properties of FliH, an ATPase regulatory component of the *Salmonella* type III flagellar export apparatus. *J Mol Biol* **322**: 281-290.
- Minamino, T., Saijo-Hamano, Y., Furukawa, Y., Gonzalez-Pedrajo, B., Macnab, R.M., and Namba, K. (2004) Domain organization and function of *Salmonella* FliK, a flagellar hook-length control protein. *J Mol Biol* **341**: 491-502.
- Minamino, T., Imada, K., and Namba, K. (2008a) Molecular motors of the bacterial flagella. *Curr Opin Struct Biol* **18**: 693-701.
- Minamino, T., Imada, K., and Namba, K. (2008b) Mechanisms of type III protein export for bacterial flagellar assembly. *Mol Biosyst* **4**: 1105-1115.
- Minamino, T., and Namba, K. (2008) Distinct roles of the FliI ATPase and proton motive force in bacterial flagellar protein export. *Nature* **451**: 485-488.
- Moens, S., and Vanderleyden, J. (1996) Functions of bacterial flagella. *Crit Rev Microbiol* **22**: 67-100.
- Moens, S., and Vanderleyden, J. (1997) Glycoproteins in prokaryotes. *Arch Microbiol* **168**: 169-175.
- Mohr, C.D., MacKichan, J.K., and Shapiro, L. (1998) A membrane-associated protein, FliX, is required for an early step in *Caulobacter* flagellar assembly. *J Bacteriol* **180**: 2175-2185.
- Molofsky, A.B., Byrne, B.G., Whitfield, N.N., Madigan, C.A., Fuse, E.T., Tateda, K., and Swanson, M.S. (2006) Cytosolic recognition of flagellin by mouse macrophages restricts *Legionella pneumophila* infection. *J Exp Med* **203**: 1093-1104.
- Moreno, E., Stackebrandt, E., Dorsch, M., Wolters, J., Busch, M., and Mayer, H. (1990) *Brucella abortus* 16S rRNA and lipid A reveal a phylogenetic relationship with members of the alpha-2 subdivision of the class Proteobacteria. *J Bacteriol* **172**: 3569-3576.
- Moreno, E., Cloeckert, A., and Moriyon, I. (2002) *Brucella* evolution and taxonomy. *Vet Microbiol* **90**: 209-227.
- Moriya, N., Minamino, T., Hughes, K.T., Macnab, R.M., and Namba, K. (2006) The type III flagellar export specificity switch is dependent on FliK ruler and a molecular clock. *J Mol Biol* **359**: 466-477.
- Moya, A., Pereto, J., Gil, R., and Latorre, A. (2008) Learning how to live together: genomic insights into prokaryote-animal symbioses. *Nat Rev Genet* **9**: 218-229.
- Muir, R.E., and Gober, J.W. (2002) Mutations in FliB that relieve the dependency on flagellum assembly alter the temporal and spatial pattern of developmental transcription in *Caulobacter crescentus*. *Mol Microbiol* **43**: 597-615.

- Muir, R.E., and Gober, J.W. (2004) Regulation of FlbD activity by flagellum assembly is accomplished through direct interaction with the trans-acting factor, FliX. *Mol Microbiol* **54**: 715-730.
- Muir, R.E., and Gober, J.W. (2005) Role of integration host factor in the transcriptional activation of flagellar gene expression in *Caulobacter crescentus*. *J Bacteriol* **187**: 949-960.
- Muramoto, K., Makishima, S., Aizawa, S., and Macnab, R.M. (1999) Effect of hook subunit concentration on assembly and control of length of the flagellar hook of *Salmonella*. *J Bacteriol* **181**: 5808-5813.
- Nakamura, S., Kami-ike, N., Yokota, J.P., Kudo, S., Minamino, T., and Namba, K. (2009) Effect of intracellular pH on the torque-speed relationship of bacterial proton-driven flagellar motor. *J Mol Biol* **386**: 332-338.
- Nakane, D., and Miyata, M. (2007) Cytoskeletal "jellyfish" structure of *Mycoplasma mobile*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 19518-19523.
- Namba, K. (2004) Image de la protéine FliD dans le filament. In <http://www.nanonet.go.jp/english/mailmag/2004/files/011a5.jpg>.
- Nambu, T., Minamino, T., Macnab, R.M., and Kutsukake, K. (1999) Peptidoglycan-hydrolyzing activity of the FlgJ protein, essential for flagellar rod formation in *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **181**: 1555-1561.
- Nambu, T., and Kutsukake, K. (2000) The *Salmonella* FlgA protein, a putative periplasmic chaperone essential for flagellar P ring formation. *Microbiology* **146** (Pt 5): 1171-1178.
- Nambu, T., Inagaki, Y., and Kutsukake, K. (2006) Plasticity of the domain structure in FlgJ, a bacterial protein involved in flagellar rod formation. *Genes Genet Syst* **81**: 381-389.
- Nasser, W., and Reverchon, S. (2007) New insights into the regulatory mechanisms of the LuxR family of quorum sensing regulators. *Anal Bioanal Chem* **387**: 381-390.
- Nather, D.J., Rachel, R., Wanner, G., and Wirth, R. (2006) Flagella of *Pyrococcus furiosus*: multifunctional organelles, made for swimming, adhesion to various surfaces, and cell-cell contacts. *J Bacteriol* **188**: 6915-6923.
- Ng, S.Y., Chaban, B., and Jarrell, K.F. (2006) Archaeal flagella, bacterial flagella and type IV pili: a comparison of genes and posttranslational modifications. *J Mol Microbiol Biotechnol* **11**: 167-191.
- Niedergang, F., and Kweon, M.N. (2005) New trends in antigen uptake in the gut mucosa. *Trends Microbiol* **13**: 485-490.
- Niehus, E., Gressmann, H., Ye, F., Schlapbach, R., Dehio, M., Dehio, C., Stack, A., Meyer, T.F., Suerbaum, S., and Josenhans, C. (2004) Genome-wide analysis of transcriptional hierarchy and feedback regulation in the flagellar system of *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol* **52**: 947-961.
- Nijskens, C. (2007) Caractérisation de deux facteurs de virulence de *Brucella melitensis* 16M : le flagelle et VirB, le système de sécrétion de type IV. In *Biology Namur: FUNDP*.
- Nijskens, C., Copin, R., De Bolle, X., and Letesson, J.J. (2008) Intracellular rescuing of a *B. melitensis* 16M virB mutant by co-infection with a wild type strain. *Microb Pathog* **45**: 134-141.
- Norqvist, A., and Wolf-Watz, H. (1993) Characterization of a novel chromosomal virulence locus involved in expression of a major surface flagellar sheath antigen of the fish pathogen *Vibrio anguillarum*. *Infect Immun* **61**: 2434-2444.
- Noviello, S., Gallo, R., Kelly, M., Limberger, R.J., DeAngelis, K., Cain, L., Wallace, B., and Dumas, N. (2004) Laboratory-acquired brucellosis. *Emerg Infect Dis* **10**: 1848-1850.

- Oberpichler, I., Rosen, R., Rasouly, A., Vugman, M., Ron, E.Z., and Lamparter, T. (2008) Light affects motility and infectivity of *Agrobacterium tumefaciens*. *Environ Microbiol* **10**: 2020-2029.
- Obuchowski, P.L., and Jacobs-Wagner, C. (2008) PflI, a protein involved in flagellar positioning in *Caulobacter crescentus*. *J Bacteriol* **190**: 1718-1729.
- Ohnishi, K., Ohto, Y., Aizawa, S., Macnab, R.M., and Iino, T. (1994) FlgD is a scaffolding protein needed for flagellar hook assembly in *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **176**: 2272-2281.
- OIE (2008) Brucellosis. In www.oie.int.
- O'Toole, P.W., Lane, M.C., and Porwollik, S. (2000) *Helicobacter pylori* motility. *Microbes Infect* **2**: 1207-1214.
- Ottemann, K.M., and Miller, J.F. (1997) Roles for motility in bacterial-host interactions. *Mol Microbiol* **24**: 1109-1117.
- Packer, H.L., Lawther, H., and Armitage, J.P. (1997) The *Rhodobacter sphaeroides* flagellar motor is a variable-speed rotor. *FEBS Lett* **409**: 37-40.
- Pallen, M.J., Penn, C.W., and Chaudhuri, R.R. (2005) Bacterial flagellar diversity in the post-genomic era. *Trends Microbiol* **13**: 143-149.
- Pallen, M.J., and Matzke, N.J. (2006) From The Origin of Species to the origin of bacterial flagella. *Nat Rev Microbiol* **4**: 784-790.
- Pandza, S., Baetens, M., Park, C.H., Au, T., Keyhan, M., and Matin, A. (2000) The G-protein FlhF has a role in polar flagellar placement and general stress response induction in *Pseudomonas putida*. *Mol Microbiol* **36**: 414-423.
- Pappas, G., Akritidis, N., Bosilkovski, M., and Tsianos, E. (2005) Brucellosis. *N Engl J Med* **352**: 2325-2336.
- Pappas, G., Panagopoulou, P., Christou, L., and Akritidis, N. (2006a) *Brucella* as a biological weapon. *Cell Mol Life Sci* **63**: 2229-2236.
- Pappas, G., Papadimitriou, P., Akritidis, N., Christou, L., and Tsianos, E.V. (2006b) The new global map of human brucellosis. *Lancet Infect Dis* **6**: 91-99.
- Park, S.Y., Lowder, B., Bilwes, A.M., Blair, D.F., and Crane, B.R. (2006) Structure of FliM provides insight into assembly of the switch complex in the bacterial flagella motor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 11886-11891.
- Passmore, S.E., Meas, R., and Marykwas, D.L. (2008) Analysis of the FliM/FliG motor protein interaction by two-hybrid mutation suppression analysis. *Microbiology* **154**: 714-724.
- Paul, K., and Blair, D.F. (2006) Organization of FliN subunits in the flagellar motor of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **188**: 2502-2511.
- Paul, K., Harmon, J.G., and Blair, D.F. (2006) Mutational analysis of the flagellar rotor protein FliN: identification of surfaces important for flagellar assembly and switching. *J Bacteriol* **188**: 5240-5248.
- Paul, K., Erhardt, M., Hirano, T., Blair, D.F., and Hughes, K.T. (2008) Energy source of flagellar type III secretion. *Nature* **451**: 489-492.
- Paul, R., Weiser, S., Amiot, N.C., Chan, C., Schirmer, T., Giese, B., and Jenal, U. (2004) Cell cycle-dependent dynamic localization of a bacterial response regulator with a novel diguanylate cyclase output domain. *Genes Dev* **18**: 715-727.
- Pereira, L.E., Brahmachary, P., and Hoover, T.R. (2006) Characterization of *Helicobacter pylori* sigma54 promoter-binding activity. *FEMS Microbiol Lett* **259**: 20-26.
- Plano, G.V., Day, J.B., and Ferracci, F. (2001) Type III export: new uses for an old pathway. *Mol Microbiol* **40**: 284-293.

- Platzter, J., Sterr, W., Hausmann, M., and Schmitt, R. (1997) Three genes of a motility operon and their role in flagellar rotary speed variation in *Rhizobium meliloti*. *J Bacteriol* **179**: 6391-6399.
- Poggio, S., Abreu-Goodger, C., Fabela, S., Osorio, A., Dreyfus, G., Vinuesa, P., and Camarena, L. (2007) A complete set of flagellar genes acquired by horizontal transfer coexists with the endogenous flagellar system in *Rhodobacter sphaeroides*. *J Bacteriol* **189**: 3208-3216.
- Poly, F., Ewing, C., Goon, S., Hickey, T.E., Rockabrand, D., Majam, G., Lee, L., Phan, J., Savarino, N.J., and Guerry, P. (2007) Heterogeneity of a *Campylobacter jejuni* protein that is secreted through the flagellar filament. *Infect Immun* **75**: 3859-3867.
- Porte, F., Liautard, J.P., and Kohler, S. (1999) Early acidification of phagosomes containing *Brucella suis* is essential for intracellular survival in murine macrophages. *Infect Immun* **67**: 4041-4047.
- Porter, S.L., Wadhams, G.H., Martin, A.C., Byles, E.D., Lancaster, D.E., and Armitage, J.P. (2006) The CheYs of *Rhodobacter sphaeroides*. *J Biol Chem* **281**: 32694-32704.
- Potvin, E., Sanschagrin, F., and Levesque, R.C. (2008) Sigma factors in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Rev* **32**: 38-55.
- Power, P.M., and Jennings, M.P. (2003) The genetics of glycosylation in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Lett* **218**: 211-222.
- Raivio, T.L., and Silhavy, T.J. (2001) Periplasmic stress and ECF sigma factors. *Annu Rev Microbiol* **55**: 591-624.
- Rambow-Larsen, A.A., Rajashekara, G., Petersen, E., and Splitter, G. (2008) Putative quorum-sensing regulator BlxR of *Brucella melitensis* regulates virulence factors including the type IV secretion system and flagella. *J Bacteriol* **190**: 3274-3282.
- Ramos, H.C., Rumbo, M., and Sirard, J.C. (2004) Bacterial flagellins: mediators of pathogenicity and host immune responses in mucosa. *Trends Microbiol* **12**: 509-517.
- Ren, C.P., Beatson, S.A., Parkhill, J., and Pallen, M.J. (2005) The Flag-2 locus, an ancestral gene cluster, is potentially associated with a novel flagellar system from *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **187**: 1430-1440.
- Ren, T., Zamboni, D.S., Roy, C.R., Dietrich, W.F., and Vance, R.E. (2006) Flagellin-deficient *Legionella* mutants evade caspase-1- and Naip5-mediated macrophage immunity. *PLoS Pathog* **2**: e18.
- Rhodus, V.A., Suh, W.C., Nonaka, G., West, J., and Gross, C.A. (2006) Conserved and variable functions of the sigmaE stress response in related genomes. *PLoS Biol* **4**: e2.
- Rice, P.A., Yang, S., Mizuuchi, K., and Nash, H.A. (1996) Crystal structure of an IHF-DNA complex: a protein-induced DNA U-turn. *Cell* **87**: 1295-1306.
- Riepl, H., Maurer, T., Kalbitzer, H.R., Meier, V.M., Haslbeck, M., Schmitt, R., and Scharf, B. (2008) Interaction of CheY2 and CheY2-P with the cognate CheA kinase in the chemosensory-signalling chain of *Sinorhizobium meliloti*. *Mol Microbiol* **69**: 1373-1384.
- Robichaud, S., Libman, M., Behr, M., and Rubin, E. (2004) Prevention of laboratory-acquired brucellosis. *Clin Infect Dis* **38**: e119-122.
- Roop, R.M., 2nd, Bellaire, B.H., Valderas, M.W., and Cardelli, J.A. (2004) Adaptation of the *Brucellae* to their intracellular niche. *Mol Microbiol* **52**: 621-630.
- Rotter, C., Muhlbacher, S., Salamon, D., Schmitt, R., and Scharf, B. (2006) Rem, a new transcriptional activator of motility and chemotaxis in *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* **188**: 6932-6942.
- Roujeinikova, A. (2008) Crystal structure of the cell wall anchor domain of MotB, a stator component of the bacterial flagellar motor: implications for peptidoglycan recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 10348-10353.

- Rowley, G., Spector, M., Kormanec, J., and Roberts, M. (2006) Pushing the envelope: extracytoplasmic stress responses in bacterial pathogens. *Nat Rev Microbiol* **4**: 383-394.
- Roy, C.R. (2005) Bacterial subversion of the host secretory pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 1271-1272.
- Roy, C.R., and Zamboni, D.S. (2006) Cytosolic detection of flagellin: a deadly twist. *Nat Immunol* **7**: 549-551.
- Roy, K., Hilliard, G.M., Hamilton, D.J., Luo, J., Ostmann, M.M., and Fleckenstein, J.M. (2009) Enterotoxigenic *Escherichia coli* EtpA mediates adhesion between flagella and host cells. *Nature* **457**: 594-598.
- Rumbo, M., Nempont, C., Kraehenbuhl, J.P., and Sirard, J.C. (2006) Mucosal interplay among commensal and pathogenic bacteria: lessons from flagellin and Toll-like receptor 5. *FEBS Lett* **580**: 2976-2984.
- Ryan, K.A., Karim, N., Worku, M., Penn, C.W., and O'Toole, P.W. (2005) *Helicobacter pylori* flagellar hook-filament transition is controlled by a FliK functional homolog encoded by the gene HP0906. *J Bacteriol* **187**: 5742-5750.
- Sagi, Y., Khan, S., and Eisenbach, M. (2003) Binding of the chemotaxis response regulator CheY to the isolated, intact switch complex of the bacterial flagellar motor: lack of cooperativity. *J Biol Chem* **278**: 25867-25871.
- Saier, M.H., Jr. (2004) Evolution of bacterial type III protein secretion systems. *Trends Microbiol* **12**: 113-115.
- Saijo-Hamano, Y., Uchida, N., Namba, K., and Oosawa, K. (2004) In vitro characterization of FlgB, FlgC, FlgF, FlgG, and FliE, flagellar basal body proteins of *Salmonella*. *J Mol Biol* **339**: 423-435.
- Sal, M.S., Li, C., Motalab, M.A., Shibata, S., Aizawa, S., and Charon, N.W. (2008) *Borrelia burgdorferi* uniquely regulates its motility genes and has an intricate flagellar hook-basal body structure. *J Bacteriol* **190**: 1912-1921.
- Salazar-Gonzalez, R.M., and McSorley, S.J. (2005) *Salmonella* flagellin, a microbial target of the innate and adaptive immune system. *Immunol Lett* **101**: 117-122.
- Salazar-Gonzalez, R.M., Srinivasan, A., Griffin, A., Muralimohan, G., Ertelt, J.M., Ravindran, R., Vella, A.T., and McSorley, S.J. (2007) *Salmonella* flagellin induces bystander activation of splenic dendritic cells and hinders bacterial replication in vivo. *J Immunol* **179**: 6169-6175.
- Samatey, F.A., Imada, K., Nagashima, S., Vonderviszt, F., Kumasaka, T., Yamamoto, M., and Namba, K. (2001) Structure of the bacterial flagellar protofilament and implications for a switch for supercoiling. *Nature* **410**: 331-337.
- Samatey, F.A., Matsunami, H., Imada, K., Nagashima, S., Shaikh, T.R., Thomas, D.R., Chen, J.Z., Derosier, D.J., Kitao, A., and Namba, K. (2004) Structure of the bacterial flagellar hook and implication for the molecular universal joint mechanism. *Nature* **431**: 1062-1068.
- Sar, N., McCarter, L., Simon, M., and Silverman, M. (1990) Chemotactic control of the two flagellar systems of *Vibrio parahaemolyticus*. *J Bacteriol* **172**: 334-341.
- Sato, K., and Homma, M. (2000) Functional reconstitution of the Na(+)-driven polar flagellar motor component of *Vibrio alginolyticus*. *J Biol Chem* **275**: 5718-5722.
- Sauviac, L., Philippe, H., Phok, K., and Bruand, C. (2007) An extracytoplasmic function sigma factor acts as a general stress response regulator in *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* **189**: 4204-4216.
- Scharf, B., Schuster-Wolff-Buhring, H., Rachel, R., and Schmitt, R. (2001) Mutational analysis of the *Rhizobium lupini* H13-3 and *Sinorhizobium meliloti* flagellin genes:

- importance of flagellin A for flagellar filament structure and transcriptional regulation. *J Bacteriol* **183**: 5334-5342.
- Scharf, B. (2002) Real-time imaging of fluorescent flagellar filaments of *Rhizobium lupini* H13-3: flagellar rotation and pH-induced polymorphic transitions. *J Bacteriol* **184**: 5979-5986.
- Schirm, M., Soo, E.C., Aubry, A.J., Austin, J., Thibault, P., and Logan, S.M. (2003) Structural, genetic and functional characterization of the flagellin glycosylation process in *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol* **48**: 1579-1592.
- Schirm, M., Arora, S.K., Verma, A., Vinogradov, E., Thibault, P., Ramphal, R., and Logan, S.M. (2004) Structural and genetic characterization of glycosylation of type a flagellin in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **186**: 2523-2531.
- Schmitt, R. (2002) Sinorhizobial chemotaxis: a departure from the enterobacterial paradigm. *Microbiology* **148**: 627-631.
- Schoenhals, G.J., and Macnab, R.M. (1996) Physiological and biochemical analyses of FlgH, a lipoprotein forming the outer membrane L ring of the flagellar basal body of *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **178**: 4200-4207.
- Scholz, H.C., Hubalek, Z., Sedlacek, I., Vergnaud, G., Tomaso, H., Al Dahouk, S., Melzer, F., Kampfer, P., Neubauer, H., Cloeckert, A., Maquart, M., Zygmunt, M.S., Whatmore, A.M., Falsen, E., Bahn, P., Gollner, C., Pfeffer, M., Huber, B., Busse, H.J., and Nockler, K. (2008) *Brucella microti* sp. nov., isolated from the common vole *Microtus arvalis*. *Int J Syst Evol Microbiol* **58**: 375-382.
- Schurig, G.G., Sriranganathan, N., and Corbel, M.J. (2002) Brucellosis vaccines: past, present and future. *Vet Microbiol* **90**: 479-496.
- Shaikh, T.R., Thomas, D.R., Chen, J.Z., Samatey, F.A., Matsunami, H., Imada, K., Namba, K., and Derosier, D.J. (2005) A partial atomic structure for the flagellar hook of *Salmonella typhimurium*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 1023-1028.
- Shen, A., and Higgins, D.E. (2006) The MogR transcriptional repressor regulates nonhierarchal expression of flagellar motility genes and virulence in *Listeria monocytogenes*. *PLoS Pathog* **2**: e30.
- Shibata, S., Takahashi, N., Chevance, F.F., Karlinsey, J.E., Hughes, K.T., and Aizawa, S. (2007) FliK regulates flagellar hook length as an internal ruler. *Mol Microbiol* **64**: 1404-1415.
- Sieira, R., Commerci, D.J., Pietrasanta, L.I., and Ugalde, R.A. (2004) Integration host factor is involved in transcriptional regulation of the *Brucella abortus* virB operon. *Mol Microbiol* **54**: 808-822.
- Sinoquet, C., Demey, S., and Braun, F. (2008) Large-scale computational and statistical analyses of high transcription potentialities in 32 prokaryotic genomes. *Nucleic Acids Res* **36**: 3332-3340.
- Sjoblad, R.D., Emala, C.W., and Doetsch, R.N. (1983) Invited review: bacterial flagellar sheaths: structures in search of a function. *Cell Motil* **3**: 93-103.
- Skerker, J.M., and Laub, M.T. (2004) Cell-cycle progression and the generation of asymmetry in *Caulobacter crescentus*. *Nat Rev Microbiol* **2**: 325-337.
- Snyder, L.A., Loman, N.J., Futterer, K., and Pallen, M.J. (2009) Bacterial flagellar diversity and evolution: seek simplicity and distrust it? *Trends Microbiol* **17**: 1-5.
- Sohn, A.H., Probert, W.S., Glaser, C.A., Gupta, N., Bollen, A.W., Wong, J.D., Grace, E.M., and McDonald, W.C. (2003) Human neurobrucellosis with intracerebral granuloma caused by a marine mammal *Brucella* spp. *Emerg Infect Dis* **9**: 485-488.
- Song, Y.C., Jin, S., Louie, H., Ng, D., Lau, R., Zhang, Y., Weerasekera, R., Al Rashid, S., Ward, L.A., Der, S.D., and Chan, V.L. (2004) FlaC, a protein of *Campylobacter jejuni*

- TGH9011 (ATCC43431) secreted through the flagellar apparatus, binds epithelial cells and influences cell invasion. *Mol Microbiol* **53**: 541-553.
- Soscia, C., Hachani, A., Bernadac, A., Filloux, A., and Bleves, S. (2007) Cross talk between type III secretion and flagellar assembly systems in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **189**: 3124-3132.
- Sourjik, V., Muschler, P., Scharf, B., and Schmitt, R. (2000) VisN and VisR are global regulators of chemotaxis, flagellar, and motility genes in *Sinorhizobium* (*Rhizobium*) *meliloti*. *J Bacteriol* **182**: 782-788.
- Sourjik, V. (2004) Receptor clustering and signal processing in *E. coli* chemotaxis. *Trends Microbiol* **12**: 569-576.
- Soutourina, O.A., and Bertin, P.N. (2003) Regulation cascade of flagellar expression in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **27**: 505-523.
- Starr, T., Ng, T.W., Wehrly, T.D., Knodler, L.A., and Celli, J. (2008) *Brucella* intracellular replication requires trafficking through the late endosomal/lysosomal compartment. *Traffic* **9**: 678-694.
- Steiner, T.S. (2007) How flagellin and toll-like receptor 5 contribute to enteric infection. *Infect Immun* **75**: 545-552.
- Stewart, B.J., and McCarter, L.L. (2003) Lateral flagellar gene system of *Vibrio parahaemolyticus*. *J Bacteriol* **185**: 4508-4518.
- Sun, Y.H., Rolan, H.G., and Tsolis, R.M. (2007) Injection of flagellin into the host cell cytosol by *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. *J Biol Chem* **282**: 33897-33901.
- Sutterwala, F.S., and Flavell, R.A. (2009) NLRC4/IPAF: a CARD carrying member of the NLR family. *Clin Immunol* **130**: 2-6.
- Suzuki, H., Yonekura, K., and Namba, K. (2004) Structure of the rotor of the bacterial flagellar motor revealed by electron cryomicroscopy and single-particle image analysis. *J Mol Biol* **337**: 105-113.
- Swartz, T.E., Tseng, T.S., Frederickson, M.A., Paris, G., Comerici, D.J., Rajashekara, G., Kim, J.G., Mudgett, M.B., Splitter, G.A., Ugalde, R.A., Goldbaum, F.A., Briggs, W.R., and Bogomolni, R.A. (2007) Blue-light-activated histidine kinases: two-component sensors in bacteria. *Science* **317**: 1090-1093.
- Szymanski, C.M., and Wren, B.W. (2005) Protein glycosylation in bacterial mucosal pathogens. *Nat Rev Microbiol* **3**: 225-237.
- Tabai, S.M., Hitchen, P.G., Day-Williams, M.J., Merino, S., Vart, R., Pang, P.C., Horsburgh, G.J., Viches, S., Wilhelms, M., Tomas, J.M., Dell, A., and Shaw, J.G. (2009) An *Aeromonas caviae* genomic island is required for both O-antigen lipopolysaccharide biosynthesis and flagellin glycosylation. *J Bacteriol* **191**: 2851-2863.
- Taguchi, F., Shibata, S., Suzuki, T., Ogawa, Y., Aizawa, S., Takeuchi, K., and Ichinose, Y. (2008) Effects of glycosylation on swimming ability and flagellar polymorphic transformation in *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* 6605. *J Bacteriol* **190**: 764-768.
- Takeda, K., Tsutsui, H., Yoshimoto, T., Adachi, O., Yoshida, N., Kishimoto, T., Okamura, H., Nakanishi, K., and Akira, S. (1998) Defective NK cell activity and Th1 response in IL-18-deficient mice. *Immunity* **8**: 383-390.
- Taminiau, B., Daykin, M., Swift, S., Boschiroli, M.L., Tibor, A., Lestrade, P., De Bolle, X., O'Callaghan, D., Williams, P., and Letesson, J.J. (2002) Identification of a quorum-sensing signal molecule in the facultative intracellular pathogen *Brucella melitensis*. *Infect Immun* **70**: 3004-3011.
- Tart, A.H., Wolfgang, M.C., and Wozniak, D.J. (2005) The alternative sigma factor AlgT represses *Pseudomonas aeruginosa* flagellum biosynthesis by inhibiting expression of *fleQ*. *J Bacteriol* **187**: 7955-7962.

- Tart, A.H., Blanks, M.J., and Wozniak, D.J. (2006) The AlgT-dependent transcriptional regulator AmrZ (AlgZ) inhibits flagellum biosynthesis in mucoid, nonmotile *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis isolates. *J Bacteriol* **188**: 6483-6489.
- Thibault, P., Logan, S.M., Kelly, J.F., Brisson, J.R., Ewing, C.P., Trust, T.J., and Guerry, P. (2001) Identification of the carbohydrate moieties and glycosylation motifs in *Campylobacter jejuni* flagellin. *J Biol Chem* **276**: 34862-34870.
- Thomas, D., Morgan, D., and DeRosier, D. (2001) Structures of bacterial flagellar motors from two FliF-FliG gene fusion mutants. *J Bacteriol.* **183**: 6404-6412.
- Thomas-Chollier, M., Sand, O., Turatsinze, J.V., Janky, R., Defrance, M., Vervisch, E., Brohee, S., and van Helden, J. (2008) RSAT: regulatory sequence analysis tools. *Nucleic Acids Res* **36**: W119-127.
- Thomashow, L.S., and Rittenberg, S.C. (1985) Isolation and composition of sheathed flagella from *Bdellovibrio bacteriovorus* 109J. *J Bacteriol* **163**: 1047-1054.
- Thompson, L.J., Merrell, D.S., Neilan, B.A., Mitchell, H., Lee, A., and Falkow, S. (2003) Gene expression profiling of *Helicobacter pylori* reveals a growth-phase-dependent switch in virulence gene expression. *Infect Immun* **71**: 2643-2655.
- Tikare, N.V., Mantur, B.G., and Bidari, L.H. (2008) Brucellar meningitis in an infant--evidence for human breast milk transmission. *J Trop Pediatr* **54**: 272-274.
- Ting, J.P., Willingham, S.B., and Bergstralh, D.T. (2008) NLRs at the intersection of cell death and immunity. *Nat Rev Immunol* **8**: 372-379.
- Toft, C., and Fares, M.A. (2008) The evolution of the flagellar assembly pathway in endosymbiotic bacterial genomes. *Mol Biol Evol* **25**: 2069-2076.
- Toker, A.S., and Macnab, R.M. (1997) Distinct regions of bacterial flagellar switch protein FliM interact with FliG, FliN and CheY. *J Mol Biol* **273**: 623-634.
- Tominaga, A., Lan, R., and Reeves, P.R. (2005) Evolutionary changes of the flhDC flagellar master operon in *Shigella* strains. *J Bacteriol* **187**: 4295-4302.
- Tsolis, R.M. (2008) Evasion of flagellin detection by both Toll-like receptor and Nod-like receptor pathways contributes to the stealth design of *Brucella* spp.
- Turatsinze, J.V., Thomas-Chollier, M., Defrance, M., and van Helden, J. (2008) Using RSAT to scan genome sequences for transcription factor binding sites and cis-regulatory modules. *Nat Protoc* **3**: 1578-1588.
- Turner, L., Ryu, W.S., and Berg, H.C. (2000) Real-time imaging of fluorescent flagellar filaments. *J Bacteriol* **182**: 2793-2801.
- Uematsu, S., Jang, M.H., Chevrier, N., Guo, Z., Kumagai, Y., Yamamoto, M., Kato, H., Sougawa, N., Matsui, H., Kuwata, H., Hemmi, H., Coban, C., Kawai, T., Ishii, K.J., Takeuchi, O., Miyasaka, M., Takeda, K., and Akira, S. (2006) Detection of pathogenic intestinal bacteria by Toll-like receptor 5 on intestinal CD11c+ lamina propria cells. *Nat Immunol* **7**: 868-874.
- Ueno, T., Oosawa, K., and Aizawa, S. (1992) M ring, S ring and proximal rod of the flagellar basal body of *Salmonella typhimurium* are composed of subunits of a single protein, FliF. *J Mol Biol* **227**: 672-677.
- Uenoyama, A., and Miyata, M. (2005) Gliding ghosts of *Mycoplasma mobile*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 12754-12758.
- Uzureau, S., Godefroid, M., Deschamps, C., Lemaire, J., De Bolle, X., and Letesson, J.J. (2007) Mutations of the quorum sensing-dependent regulator VjbR lead to drastic surface modifications in *Brucella melitensis*. *J Bacteriol* **189**: 6035-6047.
- Velasco, J., Romero, C., Lopez-Goni, I., Leiva, J., Diaz, R., and Moriyon, I. (1998) Evaluation of the relatedness of *Brucella* spp. and *Ochrobactrum anthropi* and description of *Ochrobactrum intermedium* sp. nov., a new species with a closer relationship to *Brucella* spp. *Int J Syst Bacteriol* **48 Pt 3**: 759-768.

- Venter, J.C., Remington, K., Heidelberg, J.F., Halpern, A.L., Rusch, D., Eisen, J.A., Wu, D., Paulsen, I., Nelson, K.E., Nelson, W., Fouts, D.E., Levy, S., Knap, A.H., Lomas, M.W., Nealson, K., White, O., Peterson, J., Hoffman, J., Parsons, R., Baden-Tillson, H., Pfannkoch, C., Rogers, Y.H., and Smith, H.O. (2004) Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science* **304**: 66-74.
- Vijay-Kumar, M., Wu, H., Jones, R., Grant, G., Babbitt, B., King, T.P., Kelly, D., Gewirtz, A.T., and Neish, A.S. (2006) Flagellin suppresses epithelial apoptosis and limits disease during enteric infection. *Am J Pathol* **169**: 1686-1700.
- Vinzing, M., Eitel, J., Lippmann, J., Hocke, A.C., Zahlten, J., Slevogt, H., N'Guessan P, D., Gunther, S., Schmeck, B., Hippenstiel, S., Flieger, A., Suttorp, N., and Opitz, B. (2008) NAIP and Ipaf control *Legionella pneumophila* replication in human cells. *J Immunol* **180**: 6808-6815.
- Vonderviszt, F., Imada, K., Furukawa, Y., Uedaira, H., Taniguchi, H., and Namba, K. (1998) Mechanism of self-association and filament capping by flagellar HAP2. *J Mol Biol* **284**: 1399-1416.
- Wadhams, G.H., and Armitage, J.P. (2004) Making sense of it all: bacterial chemotaxis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**: 1024-1037.
- Walker, S.L., Sojka, M., Dibb-Fuller, M., and Woodward, M.J. (1999) Effect of pH, temperature and surface contact on the elaboration of fimbriae and flagella by *Salmonella* serotype Enteritidis. *J Med Microbiol* **48**: 253-261.
- Walter, J.M., Greenfield, D., Bustamante, C., and Liphardt, J. (2007) Light-powering *Escherichia coli* with proteorhodopsin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 2408-2412.
- Wang, Q., Suzuki, A., Mariconda, S., Porwollik, S., and Harshey, R.M. (2005) Sensing wetness: a new role for the bacterial flagellum. *Embo J* **24**: 2034-2042.
- Wang, S., Fleming, R.T., Westbrook, E.M., Matsumura, P., and McKay, D.B. (2006) Structure of the *Escherichia coli* FlhDC complex, a prokaryotic heteromeric regulator of transcription. *J Mol Biol* **355**: 798-808.
- Watarai, M., Makino, S., Fujii, Y., Okamoto, K., and Shirahata, T. (2002) Modulation of *Brucella*-induced macropinocytosis by lipid rafts mediates intracellular replication. *Cell Microbiol* **4**: 341-355.
- Watarai, M. (2004) Interaction between *Brucella abortus* and cellular prion protein in lipid raft microdomains. *Microbes Infect* **6**: 93-100.
- Waters, R.C., O'Toole, P.W., and Ryan, K.A. (2007) The FliK protein and flagellar hook-length control. *Protein Sci* **16**: 769-780.
- Wei, X., and Bauer, W.D. (1998) Starvation-Induced Changes in Motility, Chemotaxis, and Flagellation of *Rhizobium meliloti*. *Appl Environ Microbiol* **64**: 1708-1714.
- Weynants, V., Gilson, D., Cloeckaert, A., Tibor, A., Denoel, P.A., Godfroid, F., Limet, J.N., and Letesson, J.J. (1997) Characterization of smooth lipopolysaccharides and O polysaccharides of *Brucella* species by competition binding assays with monoclonal antibodies. *Infect Immun* **65**: 1939-1943.
- Whitman, W.B., Coleman, D.C., and Wiebe, W.J. (1998) Prokaryotes: the unseen majority. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 6578-6583.
- Williams, A.W., Yamaguchi, S., Togashi, F., Aizawa, S.I., Kawagishi, I., and Macnab, R.M. (1996) Mutations in fliK and flhB affecting flagellar hook and filament assembly in *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **178**: 2960-2970.
- Wolfe, A.J., and Visick, K.L. (2008) Get the message out: cyclic-Di-GMP regulates multiple levels of flagellum-based motility. *J Bacteriol* **190**: 463-475.
- Wosten, M.M., Wagenaar, J.A., and van Putten, J.P. (2004) The FlgS/FlgR two-component signal transduction system regulates the fla regulon in *Campylobacter jejuni*. *J Biol Chem* **279**: 16214-16222.

- Wu, J., and Newton, A. (1997) Regulation of the *Caulobacter* flagellar gene hierarchy; not just for motility. *Mol Microbiol* **24**: 233-239.
- Yagupsky, P., and Baron, E.J. (2005) Laboratory exposures to brucellae and implications for bioterrorism. *Emerg Infect Dis* **11**: 1180-1185.
- Yamamoto, S., and Kutsukake, K. (2006) FliT acts as an anti-FlhD2C2 factor in the transcriptional control of the flagellar regulon in *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *J Bacteriol* **188**: 6703-6708.
- Yang, G.C., Schrank, G.D., and Freeman, B.A. (1977) Purification of flagellar cores of *Vibrio cholerae*. *J Bacteriol* **129**: 1121-1128.
- Yao, S.Y., Luo, L., Har, K.J., Becker, A., Ruberg, S., Yu, G.Q., Zhu, J.B., and Cheng, H.P. (2004) *Sinorhizobium meliloti* ExoR and ExoS proteins regulate both succinoglycan and flagellum production. *J Bacteriol* **186**: 6042-6049.
- Yildiz, F.H., and Visick, K.L. (2009) *Vibrio* biofilms: so much the same yet so different. *Trends Microbiol* **17**: 109-118.
- Yip, C.K., and Strynadka, N.C. (2006) New structural insights into the bacterial type III secretion system. *Trends Biochem Sci* **31**: 223-230.
- Yona-Nadler, C., Umanski, T., Aizawa, S., Friedberg, D., and Rosenshine, I. (2003) Integration host factor (IHF) mediates repression of flagella in enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *Microbiology* **149**: 877-884.
- Yonekura, K., Maki, S., Morgan, D.G., DeRosier, D.J., Vonderviszt, F., Imada, K., and Namba, K. (2000) The bacterial flagellar cap as the rotary promoter of flagellin self-assembly. *Science* **290**: 2148-2152.
- Yonekura, K., Maki-Yonekura, S., and Namba, K. (2002) Growth mechanism of the bacterial flagellar filament. *Res Microbiol* **153**: 191-197.
- Yonekura, K., Maki-Yonekura, S., and Namba, K. (2003) Complete atomic model of the bacterial flagellar filament by electron cryomicroscopy. *Nature* **424**: 643-650.
- Yonekura, K., Yakushi, T., Atsumi, T., Maki-Yonekura, S., Homma, M., and Namba, K. (2006) Electron cryomicroscopic visualization of PomA/B stator units of the sodium-driven flagellar motor in liposomes. *J Mol Biol* **357**: 73-81.
- Yorimitsu, T., and Homma, M. (2001) Na(+)-driven flagellar motor of *Vibrio*. *Biochim Biophys Acta* **1505**: 82-93.
- Young, G.M., Schmiel, D.H., and Miller, V.L. (1999) A new pathway for the secretion of virulence factors by bacteria: the flagellar export apparatus functions as a protein-secretion system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 6456-6461.
- Yu, G.X., Snyder, E.E., Boyle, S.M., Crasta, O.R., Czar, M., Mane, S.P., Purkayastha, A., Sobral, B., and Setubal, J.C. (2007) A versatile computational pipeline for bacterial genome annotation improvement and comparative analysis, with *Brucella* as a use case. *Nucleic Acids Res* **35**: 3953-3962.
- Yu, H.B., and Finlay, B.B. (2008) The caspase-1 inflammasome: a pilot of innate immune responses. *Cell Host Microbe* **4**: 198-208.
- Zamboni, D.S., Kobayashi, K.S., Kohlsdorf, T., Ogura, Y., Long, E.M., Vance, R.E., Kuida, K., Mariathasan, S., Dixit, V.M., Flavell, R.A., Dietrich, W.F., and Roy, C.R. (2006) The Birc1e cytosolic pattern-recognition receptor contributes to the detection and control of *Legionella pneumophila* infection. *Nat Immunol* **7**: 318-325.
- Zhao, K., Liu, M., and Burgess, R.R. (2007) Adaptation in bacterial flagellar and motility systems: from regulon members to 'foraging'-like behavior in *E. coli*. *Nucleic Acids Res* **35**: 4441-4452.
- Zhou, J., Lloyd, S.A., and Blair, D.F. (1998) Electrostatic interactions between rotor and stator in the bacterial flagellar motor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 6436-6441.

Zygmunt, M.S., Hagijs, S.D., Walker, J.V., and Elzer, P.H. (2006) Identification of *Brucella melitensis* 16M genes required for bacterial survival in the caprine host. *Microbes Infect* **8**: 2849-2854.

PARTIE VIII

MATERIEL

&

METHODES

VIII MATERIEL & METHODES

1. Souches de bactéries et milieu de culture

Toutes les souches de *Brucella* utilisées lors de ce travail sont dérivées de *B. melitensis* 16M NaI^R (mutant résistant spontanément à l'acide nalidixique). Toutes les souches de *Brucella* ont été cultivées dans un milieu riche 2YT (1% yeast extract, 1.6% peptone, 0.5% NaCl). La souche de *Caulobacter crescentus* CB15N a été cultivée dans un milieu composé de peptone et d'extrait de levure (milieu complexe PYE). La souche de *Sinorhizobium meliloti* a été cultivée dans un milieu Luria-Bertani (LB) avec un supplément de 2,5mM de MgSO₄ et 2.5mM de CaCl₂. Les souches d'*Escherichia coli* DH10B (Invitrogen Life-technologies), DB3.1 (Invitrogen Life-Technologies) et S17-1 (Simon 1983) ont été cultivées dans du milieu LB.

Les antibiotiques ont été utilisés suivant les concentrations suivantes : acide nalidixique, 25 mg/ml; kanamycine, 20 mg/ml; chloramphénicol, 20 mg/ml; ampicilline, 100 mg/ml. Les plasmides ont été transférés chez *B. melitensis* par conjugaison bactérienne à partir de la souche S17-1 d'*E. coli*.

2. Techniques de manipulation de l'ADN

Pour obtenir des informations concernant les manipulations générales relatives à l'ADN (digestion enzymatique, réaction de ligation, électroporation bactérienne, ...), les lecteurs sont invités à consulter l'ouvrage de référence suivant : Ausubel, 1991.

Les bactéries provenant d'une culture liquide ou d'un milieu solide sont homogénéisées dans 567 µl de TENa (50 mM Tris-HCl, pH8, 50 mM EDTA, 100 mM NaCl). Trente µl de SDS 10% et 3 µl de protéinase K (20 mg/ml 1 mM Tris-HCl pH7,5; 1 mM CaCl₂) sont ajoutés à la solution, qui sera ensuite placée dans une étuve à 37°C pendant 1h. 600 µl de phénol chloroforme sont ajoutés au mélange, puis centrifugés pendant 20 minutes à 4°C à 13500 rpm. La phase aqueuse est récupérée et additionnée de 80 µl de NaClO₄ 5M et de 600 µl de chloroforme. Le tout est centrifugé pendant 10 minutes à 4°C à 13500 rpm. La phase aqueuse est à nouveau récupérée et l'ADN est précipité à l'éthanol (EtOH 100%) (Volume d'EtOH ajouté = 1,5 x le volume de la phase aqueuse). Le culot d'ADN génomique est lavé avec de l'EtOH 70% et resuspendu dans 100 µl d'H₂O avant d'être traité à la RNase (10 mg/ml).

3. Construction des mutants par remplacement allélique avec la cassette *aphA4* (Dozot *et al.*, 2006)

Afin de limiter le risque d'obtenir un effet polaire sur les gènes en aval du gène cible à muter, nous avons utilisé une cassette *aphA4* créée à partir de la cassette *aphA3* (Dozot *et al.*, 2006) (Menard *et al.*, 1993).

Cette cassette *aphA4* contient le gène *aph* (Aminoglycoside Phosphotransferase) qui confère une résistance à la kanamycine, bordée par deux séquences particulières (Figure A1).

La séquence 1 de l'ARNm contient un site de clonage *PstI*, trois codons d'arrêt dans les trois phases, et une séquence consensus de liaison du RBS (ribosome binding site). La séquence 2 contient une autre séquence de liaison RBS suivie par un codon de démarrage, et un site de clonage *PstI*.

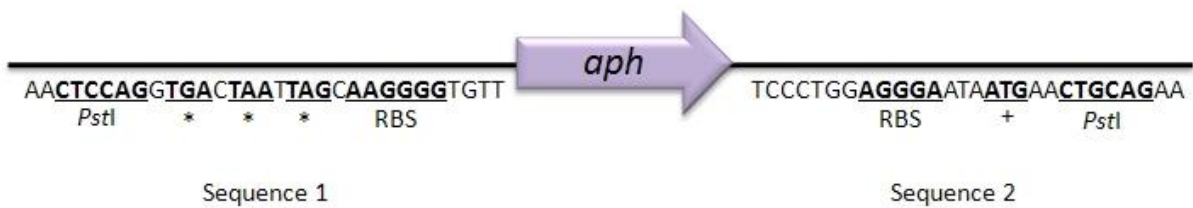


Figure A1 : Caractéristiques de la cassette *aphA4*; *aph* représente la séquence codante pour l'aminoglycoside phosphotransférase qui confère une résistance à la kanamycine. Les sites de restriction *Pst*I sont indiqués. (*) Représente les codons d'arrêt de la traduction, (+) représente le codon de démarrage, et RBS le consensus de liaison au ribosome sur l'ARNm.

La cassette *aphA4* a été clonée dans le plasmide pUC4*aphA4*. De cette façon, la cassette *aphA4* est bordée par les sites de restriction des enzymes *Pst*I, *Sal*I, *Bam*HI et *Eco*RI (Figure A2).

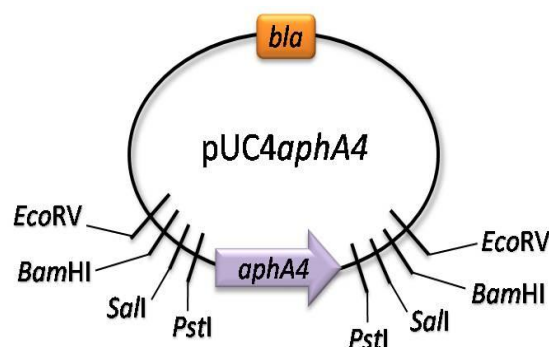


Figure A2 : Représentation schématique du plasmide pUC4*aphA4*. Les sites de restriction (*Pst*I, *Sal*I, *Bam*HI et *Eco*RV) permettent l'excision de la cassette *aphA4* du plasmide pUC4*aphA4*. *bla*, gène de résistance à l'ampicilline.

La mutation du gène cible *X* par utilisation de la cassette *aphA4* a été effectuée comme suit (voir Figure A3): les régions en amont et en aval du gène *X* ont été amplifiées par PCR à partir d'ADN génomique de *B. melitensis* 16M. Une seconde PCR a été effectuée pour associer les deux produits de la PCR précédente. Le nouveau produit PCR (comprenant la partie amont et aval du gène *X*) a été inséré dans le site *Eco*RV du plasmide pSKoriT*cat* pour former le plasmide pSKoriT*cat*-Δ*X*.

Ensuite, la cassette *aphA4* a été excisée du pUC4*aphA4* par restriction avec l'enzyme *Bam*HI puis clonée dans le plasmide pSKoriT*cat*- Δ X par insertion dans le site *Bgl*III. De cette façon, le plasmide de délétion pSKoriT*cat* Δ X::*aphA4* a été créé (Figure A4).

Pour terminer, ce plasmide a été transféré chez *B. melitensis* par conjugaison et les événements de double recombinaison ont été sélectionnés pour leur résistance à la kanamycine (résistance acquise par le gène *aphA4*) et leur sensibilité au chloramphénicol. Le phénotype de résistance à la kanamycine et de sensibilité au chloramphénicol est attendu pour les clones ayant subi la double recombinaison. Le génotype des mutants a ensuite été vérifié par une PCR diagnostique.

Les amorces utilisées pour les deux PCR lors de la création du plasmide de délétion ont été dessinées afin d'avoir (1) le codon de démarrage de la traduction du gène *X* en phase avec un des trois codons d'arrêt présents dans la cassette *aphA4*, (2) le codon de démarrage de la traduction à la fin de la cassette *aphA4* en phase avec le codon d'arrêt de la traduction du gène *X*. En résumé, lorsque le gène *X* est délété, un nouvel opéron dépendant du même promoteur et du même terminateur est créé (Figure A3). De cette façon, aucun promoteur ou terminateur n'est introduit dans l'opéron, et nous pouvons nous attendre à ce que la transcription et la traduction de l'opéron ne soient pas perturbées.

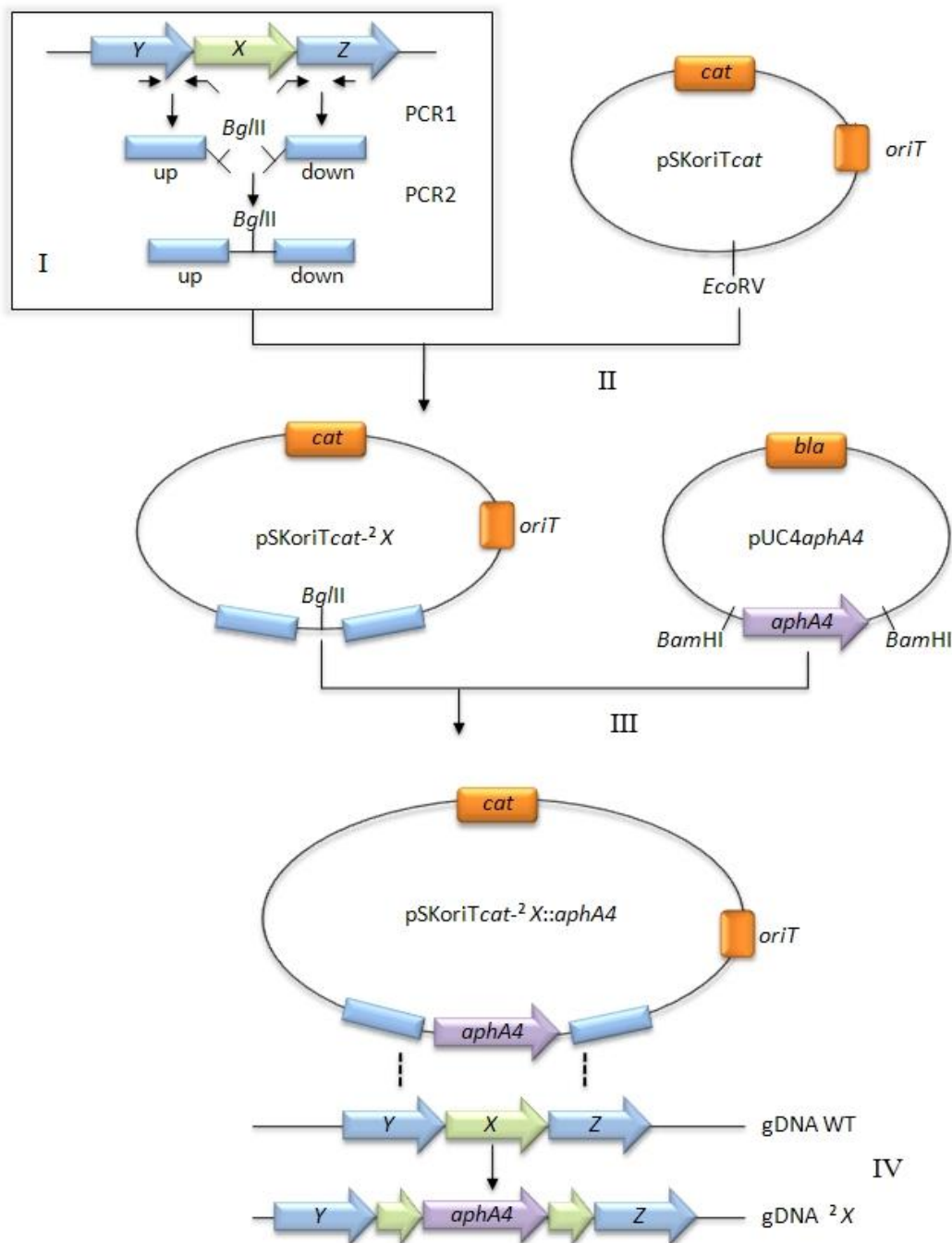


Figure A3 : Mutation du gène X par utilisation de la cassette *aphA4*. I) Amplification et association par PCR des régions en amont et en aval du gène X. II) Clonage du produit de la PCR (amont/aval) dans le plasmide pSKoriTcat générant le plasmide pSKoriTcat- Δ X. III) Clonage de la cassette *aphA4* dans le site de restriction *Bgl*III du plasmide pSKoriTcat- Δ X générant le plasmide de délétion pSKoriTcat- Δ X::*aphA4*. L'étape IV présente la sélection des événements de double recombinaison après le transfert du plasmide de délétion pSKoriTcat- Δ X::*aphA4* chez *B. melitensis*. *bla* et *cat* sont les gènes qui confèrent une résistance à l'ampicilline et au chloramphénicol.

4. Construction des plasmides

4.1 Construction des plasmides rapporteurs pBBCmp*flgE-lacZ* et pBBCmp*fliC-lacZ*

Pour suivre l'activité du promoteur de *flgE* et *fliC*, nous avons construit les plasmides pBBCmp*fliC-lacZ* et pBBCmp*flgE-lacZ* en fusionnant le promoteur de ces gènes en amont du gène *lacZ*.

Nous avons utilisé le plasmide pBBR1MCS dont la région codante du gène *lacZ* est déléetée des 27 premiers nucléotides. Ce plasmide a déjà servi pour la construction du plasmide pBBCmp*fliF-lacZ* et pBBCmp*flcR-lacZ* (Fretin *et al.*, 2005) (Leonard *et al.*, 2007).

Une région de 686 nucléotides contenant le promoteur de *fliC* a été amplifiée de l'ADN génomique de *B. melitensis* 16M Nal^R avec les amorces *pflfC* amont (5'-ATATCTAGACAACCCCGCCTCTGTCA-3') et *pflfC* aval (5'-ATTGGATCCGCAAGCGTCTGGAGAGC-3') contenant respectivement des sites de restriction *XbaI* (en vert) et *BamHI* (en bleu).

De la même façon, une région de 589 nucléotides contenant le promoteur de *flgE* a été amplifiée avec les amorces *pflgE* amont (5'-ATATCTAGAGGGTTCGATCCTATCGATT-3') et *pflgE* aval (5'-ATTGGATCCCGTTTCCGCGCGCTTGTA-3'). Le produit de la réaction PCR a d'abord été cloné dans un vecteur pGEM-T Easy (PROMEGA), puis inséré en phase en amont du gène rapporteur *lacZ* dans un plasmide pBBR1MCS résistant au chloramphénicol.

4.2 Construction des plasmides d'expression des gènes *flaF*, *flbT* et *fliC*

Les plasmides d'expression de *flaF*, *flbT* et *fliC* de *B. melitensis* ont été construits à partir des plasmides pRH001 (dérivé du plasmide pMR10) et pRH002 (dérivé du plasmide pBBR1 MCS-1). Ces deux plasmides ont été aménagés pour permettre l'utilisation de la technique GatewayTM (Invitrogen) (Hallez *et al.*, 2007a). Les vecteurs de destination pRH001 et pRH002 sont résistants au chloramphénicol et possèdent une cassette toxique *ccdB*. La cassette *ccdB* est bordée par les sites de recombinaison *attR1* et *attR2*. La procédure de clonage par recombinaison LR a été effectuée selon la procédure décrite par Invitrogen Life-Technologies.

Les gènes *fliC*, *flbT* et *flaF* transférés dans les vecteurs de destination pRH001 et pRH002 proviennent de l'ORFeome GatewayTM (Invitrogen) de *B. melitensis* (Dricot *et al.*, 2004). Ces ORFs présentes sur les plasmides pDONR201 (Invitrogen) ont été transférées lors d'une réaction LR (réaction de recombinaison utilisant un mix contenant l'enzyme clonase LR) vers les vecteurs de destination pRH001 ou pRH002.

Pour la complémentation hétérologue, le gène complet *flbT* de *S. meliloti* (SMc03051) et *C. crescentus* (CC_1458) ont été clonés à partir d'une amplification PCR sur l'ADN génomique isolé de la souche Rm1021 de *S. meliloti* et CB15N de *C. crescentus*. L'amplification de *flbT* avec des amorces contenant les sites de recombinaison *attL1* et *attL2* a permis de cloner ce gène dans les vecteurs de destination pRH001 et pRH002 en utilisant la technique de recombinaison Gateway™ (Invitrogen).

4.3 Construction des plasmides pour la création des mutants *fliF*, *flgE*, *fliC* et *flbT*

Les mutants *fliF*, *flgE*, *fliC* et *flbT* de *B. melitensis* 16M ont été obtenus par remplacement du gène cible par une cassette *aphA4* (voir section précédente). Les régions des gènes cibles bordant la cassette *aphA4* ont été amplifiées à partir des amorces suivantes (Tableau ci-dessous).

Les plasmides de délétion obtenus (pSKoriTcat- Δ *fliF*::*aphA4*, pSKoriTcat- Δ *flgE*::*aphA4*, pSKoriTcat- Δ *fliC*::*aphA4* et pSKoriTcat- Δ *flbT*::*aphA4*) ont été transférés dans la souche de *E. coli* S17-1 puis introduits par conjugaison dans une souche de *B. melitensis* 16M.

Amorces	Séquence
FP <i>fliF</i> amont	5'-GCCTCGGACGATACTGCT-3'
RP <i>fliF</i> amont	5'-AATTCCCCCGGGGAGATCTCCGCTGGAAATTCTGCTGCA-3'
FT <i>fliF</i> aval	5'-GGAGATCTCCCCGGGGGAATTGCGAAGGCATCGGCCATG-3'
RT <i>fliF</i> aval	5'-GCGATGCGACGGGCAAAT-3'
FP <i>flgE</i> amont	5'-GCCATATCAGCAAATGCGCA-3'
RP <i>flgE</i> amont	5'-AATTCCCCCGGGGAGATCTCCCTGAGCATTATTCCCGAAA-3'
FT <i>flgE</i> aval	5'-GGAGATCTCCCCGGGGGAATTGTGCTGGTTAATCTGAAGAGA-3'
RT <i>flgE</i> aval	5'-GTCGCGCAGATCGCCGAT-3'
FP <i>fliC</i> amont	5'-GCAACTGCGTTTCAACATCAT-3'
RP <i>fliC</i> amont	5'-AATTCCCCCGGGGAGATCTCCGAGCCGACGAGTTTGTAAAGAA-3'
FT <i>fliC</i> 3	5'-GGAGATCTCCCCGGGGGAATTGCGGGCTAATAAACCGGA-3'
RT <i>fliC</i> aval	5'-CGCAAGGCCCATGCGGTT-3'
FP <i>FlbT</i>	5'-CCTCCTCAACTATCTGAGGTA-3'
RP <i>FlbT</i>	5'-AATTCCCCCGGGGAGATCTCCCGGATTGCCGTTTTGCTGT-3'
FT <i>flbT</i> 2	5'-GGAGATCTCCCCGGGGGAATTGGGGCAAATCCATGACGACGA-3'
RT <i>FlbT</i>	5'-CGGTCAGCACGGTCCAGAT-3'

Tableau A1: Liste des amorces utilisées pour la construction des mutants *fliF*, *flgE*, *fliC* et *flbT*. Les parties vertes et bleues représentent les séquences complémentaires créées entre la région amont et la région aval du gène muté. La séquence soulignée est le site de restriction de l'enzyme *Bgl*III.

5. Migration de protéines en gel SDS-PAGE et détection par Western Blot

Du milieu riche (2YT) a été inoculé avec les souches d'intérêt puis placé dans une étuve à 37°C sous agitation pendant une nuit. Les cultures bactériennes ont ensuite été diluées dans 5 ml de 2YT pour obtenir une DO₆₀₀ finale de 0.05. Après une incubation à 37°C, les bactéries ont été inactivées à la chaleur lors d'une incubation d'une heure dans un bain à 80°C, puis conservées au frigo pendant au maximum une nuit. Les cultures ont ensuite été centrifugées et le culot resuspendu dans du PBS 1X dans un volume tel que la DO₆₀₀ finale soit égale à 6, puis conservées à -20°C.

20 µl d'échantillon contenant 1 µl de bleu de chargement (SDS 2%, Tris 62,5 mM, 2-mercaptoethanol 5%, glycerol 10%, bleu de bromophenol 0,01%, pH6.8) est analysé par puit. Les protéines ont été recueillies après une migration dans un gel de polyacrylamide 12% et transférées sur une membrane de nitrocellulose (Amersham).

La détection de protéines a été réalisée avec un anticorps polyclonal anti-FliC (dilué 1/3000) et anti-FlgE (dilué 1/5000). La détection des anticorps a été réalisée en utilisant un anticorps secondaire de chèvre anti-lapin conjugués à la peroxidase HRP (Amersham). La détection des anticorps HRP a été réalisée par chémoluminescence grâce aux réactifs du kit de révélation ECL Western blotting RPN2209 (Amersham Pharmacia Biotech). Les résultats de la révélation sont observés par autoradiographie grâce à des films Fujifilm (Fuji Medical X-Ray Film). La détection donne de bons résultats après 1 minute 30 d'exposition pour l'anticorps anti-FlgE et 5 minutes d'exposition pour l'anticorps anti-FliC.

6. Visualisation du flagelle en microscopie électronique à transmission (TEM) et immunomarquage aux billes d'or

Les bactéries ont été cultivées en milieu de culture riche 2YT à 37°C jusqu'à une DO₆₀₀ de 0.25. Les bactéries ont ensuite été centrifugées à 1000 rpm pendant 20 minutes (centrifugeuse Juan), puis lavées dans du PBS 1X et fixées pendant 20 minutes dans 50 µl de paraformaldehyde 4% à un pH de 7,3. Les bactéries ont ensuite été stockées à 4°C pendant une nuit minimum.

Pour la coloration, une goutte d'une solution de bleu Alcian est préalablement déposée sur un morceau de parafilm. Une grille recouverte de Formvar-Carbone est déposée sur la goutte pendant 5 minutes, puis rincée successivement sur 5 gouttes d'eau stérile. Ensuite, la grille est déposée sur une goutte de bactéries pendant 10 minutes. La grille est ensuite rincée par le passage successif sur 5 gouttes d'eau stérile, puis déposée 10 secondes sur une goutte d'acétate d'uranyle 2%.

L'utilisation d'un papier absorbant au coin de la grille permet d'enlever l'excédent de solution. La grille est ensuite rangée dans une boîte et doit sécher pendant plusieurs heures avant l'observation au microscope électronique à transmission (Tecnai 10, Philips).

Pour le marquage aux billes d'or, une fois que la grille a été déposée sur la goutte d'échantillon bactérien, elle est placée sur des gouttes des tampons suivants : lavages successifs sur 5 gouttes de PBS contenant 5% de glycine, 1 minute sur une goutte de PBS-BSA (bovine serum albumine) 5%, 1 heure sur une goutte de PBS-BSA contenant des anticorps monoclonaux anti-LPS de *Brucella* (Epitope M chaîne-O mAB A156b3b2, (Weynants *et al.*, 1997)) dilués (1/20), lavages successifs sur 5 gouttes de PBS, 45 minutes sur une goutte de PBS-BSA contenant des anticorps monoclonaux de lapin anti-souris conjugués à des particules d'or (15 nm) dilués (1/20), lavages successifs sur 3 gouttes de PBS, lavages successifs sur 2 gouttes d'eau stérile.

7. Visualisation du flagelle en microscopie optique par coloration Ryu

Voici une brève description de la technique de coloration « Ryu » pour visualiser le flagelle. Pour une description plus complète, le lecteur est invité à lire l'article de Kodaka (Kodaka *et al.*, 1982).

7.1 Composition de la solution 1

10 ml d'une solution aqueuse avec 5% de phénol (à base de phénol en poudre); 2g d'acide tannique et 10 ml d'une solution aqueuse saturée de sulfate d'aluminium et potassium 12 hydraté.

7.2 Composition de la solution 2

Solution d'éthanol saturée en cristal violet (3 g dans 25 ml d'éthanol 95%).

Pour faire la solution finale, mélanger 10 portions de solution 1 avec 1 portion de solution 2. Par exemple 1 ml de solution 1 avec 100 µl de solution 2. Filtrer la solution finale (filtre 0,2 µm). Les solutions se conservent séparément à température ambiante à l'obscurité. Préparer la solution finale le jour de la coloration des bactéries.

7.3 Mode d'emploi

Déposer 2 µl de culture bactérienne sur une lame puis mettre un coverslip. Laisser 10 minutes pour que les bactéries s'accrochent sur la lame. Mettre deux gouttes de coloration Ryu au bord du coverslip. Avec la capillarité, le colorant diffuse dans l'échantillon. Sceller les bords, par exemple avec une solution composée de paraffine. Regarder la lame au microscope à contraste de phase et à immersion avec de l'huile.

8. Test de mobilité

La mobilité bactérienne a été testée en milieu liquide et en milieu semi-solide.

8.1 Mobilité en milieu liquide

Comme contrôle positif, nous avons visualisé la mobilité de *C. crescentus* lors d'une croissance en milieu liquide dans du PYE. Lorsque que la culture de *C. crescentus* a atteint une DO_{600} entre 0.3 et 0.6, nous avons récolté une goutte de 2 μ l de culture que nous avons déposé sur lame et scellé avec de la paraffine. Nous avons procédé de même avec une culture de *B. melitensis* en milieu liquide 2YT ou dans un milieu pauvre (5% de 2YT) à une DO_{600} entre 0.2 et 0.3. Bien qu'une mobilité soit clairement visible pour *C. crescentus*, aucune mobilité n'a pu être observée pour *Brucella*.

8.2 Mobilité sur milieu semi-solide

Pour tester la mobilité sur milieu semi-solide, nous avons comparé une souche sauvage de *B. melitensis* avec les mutants flagellaires construits. Nous avons déposé une goutte de 1 μ l de culture sur des boîtes de Pétri contenant un milieu 2YT et un milieu appauvri (5% de 2YT) avec 0,2%, 0,6% et 0,8% d'agar. Les bactéries ont soit été déposées sur le milieu de culture, ou enfoncées dans le milieu à l'aide d'un cure-dent stérile trempé préalablement dans le milieu de culture. Cependant, aucun halo de mobilité n'a pu être observé sous les conditions testées. Les boîtes sont restées à l'étuve à 37°C, à 42°C et à température ambiante pendant maximum 5 jours avec une vérification journalière.

9. Dosage de la β -galactosidase

Les plasmides pBBCmpfliC-lacZ et pBBCmpflgE-lacZ ont été transférés par conjugaison dans une souche sauvage de *B. melitensis* 16M NalR et dans les mutants, et des échantillons bactériens ont été prélevés à différents temps au long de la croissance à 37°C en milieu de culture liquide riche 2YT contenant du chloramphénicol. Un dosage de la β -galactosidase a été réalisé en suivant la méthode décrite par Miller (Miller, 1972).

La β -galactosidase est une enzyme qui clive les liens β -galactosidiques. Elle est capable d'hydrolyser le substrat chromogène synthétique ONPG (*O*-nitrophenyl- β -D-galactoside) en générant de l'*O*-nitrophénol, un composé jaune en solution aqueuse. Dès lors, la réaction peut être suivie en mesurant l'absorbance à 420 nm.

L'expérience est réalisée à partir de cellules bactériennes qui ont été perméabilisées avec du chloroforme et resuspendues dans un tampon contenant du β -mercaptoéthanol. Après incubation des échantillons en présence d'ONPG pendant un laps de temps déterminé, la réaction est arrêtée en ajoutant du Na_2CO_3 et la DO_{420} est mesurée. L'activité de la β -galactosidase est exprimée en unités Miller :

Unités de la β -galactosidase = $1000 \times (\text{DO}_{420}/\text{DO}_{600}) \times (1/t) \times d$

Où t est le temps de la réaction en minutes et d, la dilution de la culture de départ.

En pratique :

- Prélever 1 ml de chaque culture et prendre la DO_{600}
- Prélever 2 ml des différentes cultures (en eppendorfs de 2 ml) et les centrifuger pendant 5 minutes à 13000 rpm
- Eliminer les surnageants et resuspendre les culots dans 1 ml de tampon Z additionné de β -mercaptoéthanol
- Déposer 200 μl de chaque resuspension dans 800 μl de tampon Z
- Ajouter dans chaque tube 3 gouttes de chloroforme et 2 gouttes de SDS 0.1%
- Mélanger en resuspendant plusieurs fois la solution
- Déposer 200 μl d'ONPG en maintenant 10 secondes d'intervalle entre les tubes
- A la 5^{ème} minute d'incubation, déposer 500 μl de Na_2CO_3 1M en conservant 10 secondes d'intervalle entre chaque tube
- Centrifuger 5 minutes à 13000 rpm
- Prélever 1 ml de surnageant et prendre la DO_{420}

Rem: Il est souvent nécessaire de centrifuger brièvement le mélange (1 minute dans une microfuge) avant de mesurer la DO_{420} du surnageant.

Composition du tampon Z: 16,1 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 5,5 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 0,75 g KCl; 0,246 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, ajuster à pH7 et porter à 1 litre.

10. Préparation de l'ARN

L'ARN total a été extrait de la souche sauvage de *B. melitensis* et des mutants comme suit: une quantité de 45 ml de culture a été centrifugée à 3500 rpm pendant 15 minutes. Le culot bactérien a été resuspendu dans 100 μl de SDS 10% et 20 μl de protéinase K (20 mg/ml) et incubé à 37°C sous agitation pendant 1 h. Une quantité de 5 ml de TRIzol[®] Reagent (Invitrogen) a ensuite été ajouté, puis la suspension obtenue a été vigoureusement agitée.

Après 10 minutes d'incubation, 1 ml de chloroforme a été ajouté à la suspension puis après mélange du mix, incubé 5 à 10 minutes à la température de la pièce. L'échantillon a ensuite été centrifugé à 14000 rpm pendant 15 minutes à 4°C. Ensuite, un volume équivalent de 70% d'éthanol a été ajouté à la phase aqueuse puis mélangé par Vortex. L'échantillon a ensuite été transféré sur un RNA Spin Cartridge (Invitrogen) puis centrifugé à 12000 x g

pendant 15 secondes à la température de la pièce. Le RNA Spin Cartridge (Invitrogen) a été lavé avec le tampon I et II disponible avec le kit. Ensuite, l'ARN a été élué du RNA Spin Cartridge avec 100 µl d'eau « RNase-Free » et stocké à -80°C. Pour terminer, l'intégrité de l'ARN et l'absence d'ADN dans l'échantillon ont été vérifiées sur gel d'électrophorèse et la quantité d'ARN a été mesurée par NanoDrop.

11. PCR quantitative en temps réel (RT-PCR)

Les échantillons d'ARN ont été traités pour digérer l'ADN contaminant avec la DNaseI (Fermentas) puis une transcription inverse a été réalisée avec le kit « Transcriptor First Strand cDNA synthesis » (Roche). Un échantillon d'ADNc a été utilisé comme template pour les réactions de RT-PCR. Les amorces ont été choisies avec le programme « PrimerExpress® 2.0 » pour obtenir un produit PCR entre 80 et 100 paires de bases. Les réactions de PCR en temps réel ont été réalisées avec le système « SYBR Green Mix » (Applied Biosystems) avec des plaques de 96 puits « Optical Reaction plates » (Applied Biosystems). Une quantification relative a été effectuée en utilisant une méthode de courbe standard pour chaque amorce avec le système « Applied Biosystems 7900HT real-time PCR instrument » (méthode de quantification absolue). Le résultat pour chaque ARNm cible a été normalisé avec de l'ARNm de glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) et une moyenne a été réalisée.

12. Infection en souris BALB/c

L'infection de souris BALB/c avec *Brucella* a été réalisée de la manière décrite dans l'article de Fretin *et al.* (Fretin *et al.*, 2005). En résumé, des souris femelles âgées d'environ 9 semaines ont été infectées par voie intrapéritonéale avec une suspension de PBS de 0,2 ml contenant approximativement 10^4 CFU de la souche de *Brucella* appropriée.

Des groupes de 7 souris pour chaque souche ont été sacrifiées à différents intervalles après l'inoculation (c'est-à-dire 5 jours et 4 semaines). Les rates ont été récoltées et broyées dans 2 ml d'eau distillée, puis étalées sur boîtes de milieu agar 2YT suivant une série de dilutions pour déterminer la survie bactérienne. Le nombre de colonies par boîte a ensuite été comptabilisé.

Les données sont exprimées en logarithme (log) du nombre de CFU par rate. Les résultats obtenus ont été analysés par une ANOVA I après que l'homogénéité de la variance ait été vérifiée (Bartlett). La comparaison a été effectuée par un test de Scheffé. La barre d'erreur représente ± 2 SEM (Standard Error of the Mean), avec une correction de Student pour l'estimation de la variance.

PARTIE IX

ANNEXES

IX ANNEXES


ANNEXE I : RpoE box


Liste des gènes dont le promoteur possède une boîte de reconnaissance à RpoE

Séquence consensus utilisée : BRAACBWN{15,19}TCNDWN{5,6}R

Sens	Gène	Start	End	Séquence dans le promoteur	Nom du gène (KEGG)	
	NP_538989.1 BMEI0071	-132	-99	GAAACGAAGCCGTTGGAACCGCTCTATGTATTG	hypothetical protein	1
	NP_539283.1 BMEI0366	-239	-202	GAAACCTGCCTCATTTTCGGCCTGGCCTTCAATTACTTG	hypothetical protein	2
	NP_539288.1 BMEI0371	-101	-69	GAAACCTAAGGCTTTGTACGCCCTATACAGGA	rpoE1	3
	NP_539289.1 BMEI0372	-128	-92	GGAACCTTTCTCATACGCCACGTTTCTTTATCATA	two-component response regulator	4
	NP_539295.1 BMEI0378	-176	-142	GAAACCTTCCGGTTTCAAAAGCGTTCAAATAAGAG	RNA polymerase factor sigma-32	5
	NP_539368.2 BMEI0451	-59	-22	TGAACCAAGCTGTCTCCACGCCAAAGTCCGTGTCCCAA	2-isopropylmalate synthase	6
	NP_539384.1 BMEI0467	-146	-112	GGAACCACTTTGACAAAGACGAGTCTTTCTTGGG	coproporphyrinogen III oxidase	7
	NP_539427.1 BMEI0510	-169	-133	CAAACGTGCAAGCAATCGGTACGGGATCGATGATTCA	leucine-responsive regulatory protein	8
	NP_539520.1 BMEI0603	-42	-8	CAAACCTGACATCTGCACACGAATCCGTGGGATAA	hypothetical protein	9
	NP_539589.1 BMEI0672	-141	-108	GGAACCTGGACCTATCGCGCTATCGTACGGGAGA	hypothetical protein	10
	NP_539652.1 BMEI0735	-133	-97	GAAACGTCCATGCGGGGAAATCAGTTCAATGGACTGA	hypothetical protein	11
	NP_539731.1 BMEI0814	-154	-122	GAAACCTCACCTCCCAAATTTTCAGAAAATTA	penicillin-binding protein 6	12
	NP_539803.1 BMEI0886	-145	-111	CAAACCTGCACCTATTCTGGTAAATCGGTTGTGAA	coaD	13
	NP_539816.1 BMEI0899	-182	-147	CGAACCTGTACCTTAGCCGACGCTCTTTGCCCTCGA	phage-related DNA binding protein	14
	NP_539870.1 BMEI0953	-297	-263	CAAACCAAGCATTAACCATTCGGTCCGATTATGAG	hypothetical protein	15
	NP_539892.1 BMEI0975	-69	-36	CGAACCTGAGCCCATGTGAAGATCGGATAGGTA	phosphoglycolate phosphatase	16
	NP_539915.1 BMEI0998	-156	-120	TAAACCATCTCGCGAATTCGAATTCATAACTCTAG	glycosyltransferase	17
	NP_540003.1 BMEI1086	-58	-24	TAAACCTGTCTCTGCTGGCAGAAATCTGTGCCGGCA	hypothetical cytosolic protein	18
	NP_540040.1 BMEI1123	-49	-12	CAAACCTTTCGGGCTGTTTCATTCGTTCTAAATTGCA	phosphoribosylformylglycinamide synthase subunit PurS	19
	NP_540117.1 BMEI1200	-124	-87	GAAACGAGGACGATCAAGATTATGCTTCATATAAAAAG	DNA topoisomerase IV subunit A	20
	NP_540132.1 BMEI1215	-70	-33	GGAACCTCTACCTTCCAAATTCGTTTCTGAAATAGGA	hypothetical membrane spanning protein	21
	NP_540148.1 BMEI1231	-381	-348	TAAACTTACTTTACCAAGCTGTCAATTCGAACG	NADH-ubiquinone oxidoreductase 18 kD subunit	22
	NP_540148.1 BMEI1231	-70	-33	TAAACTATTGCCATGATAGATTGTCTCTCTGCGA	NADH-ubiquinone oxidoreductase 18 kD subunit	23
	NP_540231.1 BMEI1314	-92	-59	TAAACCTGGGATTTTGTAAACATCCAAGCCTCA	hypothetical protein	24
	NP_540236.1 BMEI1319	-257	-225	GAAACCTATTCCTTACCCATTCATTTCTCG	hypothetical membrane spanning protein	25
	NP_540255.1 BMEI1338	-110	-74	TAAACCTCGTCACTACAGCCTAACGTCAAAATTTGAAA	hypothetical protein	26
	NP_540262.1 BMEI1345	-178	-143	GAAACCTTCGCCTGTACGGCCTTTTCCATGGGACGA	phage minor tail protein H	27
	NP_540361.1 BMEI1444	-255	-222	CAAACCTACCCGACAGGCATTCAGTCTGCGAG	adenine-specific methyltransferase	28
	NP_540367.1 BMEI1450	-228	-195	CAAACCTTTCTGGTGCATTAATCCAAGCAAAA	threonine synthase	29
	NP_540476.1 BMEI1559	-149	-113	GAAACCAACACTCCGCTGCTTGTCTTCAAATTCACAG	salicylaldehyde dehydrogenase	30
	NP_540494.1 BMEI1577	-155	-121	CAAACCAAGCAATGTTCCAGCATTCAGTATTCGG	chitooligosaccharide deacetylase	31
	NP_540519.1 BMEI1602	-187	-150	GGAACGACAGTGGATCGAGGAAAAATCAAATCGGGCA	glycosyltransferase	32
	NP_540526.1 BMEI1609	-125	-92	CAAACGTCCCATATAATGAGGATCGATTGGAAGG	hypothetical protein	33
	NP_540553.1 BMEI1636	-61	-25	CAAACCTTCTTAAACCGCCTAATATCCGAGATTAAA	Pgi, glucose-6-phosphate isomerase	34
	NP_540799.1 BMEI1882	-44	-10	CGAACCTAGCAAAATGCTCGCAATTCGATCGGGA	fumarylpyruvate hydrolase	35
	NP_540917.1 BMEI2000	-53	-18	TAAACTTCAATGCGGCATAGATTGTCTAATAACGA	phosphatidylethanolamine N-methyltransferase	36
	NP_541059.1 BMEI0082	-154	-120	CAAACGATGCCAGCGGGTGCAGTCAATTGCTAAA	hypothetical protein	37
	NP_541071.1 BMEI0094	-187	-152	TAAACCAATACCGCCTAAATACCGTCATTATGTCGG	hypothetical protein	38
	NP_541169.1 BMEI0192	-152	-117	TAAACCTTACACAGCAGTCGCTATTCTATTAATAA	glutamate-1-semialdehyde 2,1-aminomutase	39

Sens	Gène	Start	End	Séquence dans le promoteur	Nom du gène (KEGG)	
	NP_541431.1 BMEI10453	-163	-128	TGAACCTGCCGTTGTTTCATGTACGTCTGATCGCGTG	transposase	40
	NP_541448.2 BMEI10470	-56	-20	CAAACCATATCCACGGCTACCGCTTTCTTTCCCTG	integral membrane protein	41
	NP_541453.1 BMEI10475	-291	-256	CAAACGAGCGCGCTCGTTATGGGACTCTGTTGGAAA	transcriptional regulator, GntR family	42
	NP_541496.1 BMEI10518	-292	-255	GGAACGAGGATCGATGAAATTGTGCTTCAATGTAATG	transcriptional regulator AzlB	43
	NP_541614.1 BMEI10636	-153	-116	GAAACGAGCCCGTTTTTCGCTCGCGATCTTCCATGCA	protocatechuate 3,4-dioxygenase beta chain	44
	NP_541629.1 BMEI10651	-196	-160	CAAACGAAGCTGAAATATTTGAGCTTCAGATGCAGCA	hypothetical protein	45
	NP_541668.1 BMEI10690	-149	-112	TGAACCTTTTCAGGGCGTGGATGGCGTCAGTATTTAG	FrnE	46
	NP_541782.1 BMEI10804	-268	-233	TAAACGTGCAGGATTTTCAGTAATTTCTGAAAATTG	transcriptional regulator, TetR family	47
	NP_541844.1 BMEI10866	-90	-57	GAAACTAATTGACTTGTAGGATATCCATTATCGG	oxidoreductase	48
	NP_541926.1 BMEI10948	-40	-8	CAAACGAAACCTCCCATGGTATTCAATTCGGAG	nitrite extrusion protein	49
	NP_541996.1 BMEI11018	-43	-10	TAAACGTTAAGCTCTGTCCAAATCTATTCTGGA	NADH oxidase	50
	NP_541999.1 BMEI11021	-179	-143	GAAACTAGCATAATGCAACATAATTCCTACCCCTAA	enoyl-CoA hydratase	51

 Facteur sigma

 Protéine hypothétique

 Facteur transcriptionnel

ANNEXE II : IHF box**Liste des gènes dont le promoteur possède une boîte de reconnaissance à IHF**

Séquence consensus utilisée : YAANNNTTGATW

sens	Gène	Start	End	Séquence	Nom du gène (KEGG)	
R	NP_538980.1 BMEI0062	-251	-239	CAATGGATTGATT	hypothetical protein	1
D	NP_539196.1 BMEI0279	-268	-256	CAATTTGTTGATT	CarD family transcriptional regulator	2
D	NP_539453.1 BMEI0536	-387	-375	TAACGTATTGATT	periplasmic immunogenic protein	3
D/R	NP_539457.1 BMEI0540	-89/-144	-77/-132	CAATCTCTTGATT	hypothetical protein	4
D/R	NP_539458.1 BMEI0541	-16/-71	-4/-59	TAACTCATTGATT	hypothetical protein	5
D	NP_539589.1 BMEI0672	-186	-174	TAAATCATTGATT	hypothetical protein	6
R	NP_539590.1 BMEI0673	-107	-95	TAAATCATTGATT	thiosulfate-binding protein precursor	7
R	NP_539704.1 BMEI0787	-52	-40	TAACATATTGATT	RecA	8
D	NP_539945.1 BMEI1028	-129	-117	TAATCCATTGATT	hypothetical protein	9
R	NP_540049.1 BMEI1132	-267	-255	CAAATGTTTGATA	ATPase of the PP superfamily	10
D	NP_540085.1 BMEI1168	-197	-185	TAACATATTGATT	RplM	11
D	NP_540102.2 BMEI1185	-308	-296	CAATTGATTGATT	HppA	12
D	NP_540223.1 BMEI1306	-60	-48	CAAGCCATTGATA	porin	13
R	NP_540283.1 BMEI1366	-65	-53	TAAAGGCTTGATA	hypothetical membrane spanning protein	14
D/R	NP_540365.1 BMEI1448	-40/-237	-28/-225	CAATAGTTTGATT	C-di-GMP phosphodiesterase A-related protein	15
R	NP_540493.1 BMEI1576	-264	-252	CAAGCTCTTGATT	xanthine dehydrogenase	16
D	NP_540494.1 BMEI1577	-215	-203	CAAGCTCTTGATT	chitooligosaccharide deacetylase	17
R	NP_540709.1 BMEI1792	-337	-325	CAACATATTGATA	hypothetical protein	18
D	NP_540710.1 BMEI1793	-284	-272	CAACATATTGATA	putative protease IV	19
R	NP_540747.1 BMEI1830	-126	-114	CAAAAAGTTGATA	25 kDa outer-membrane immunogenic protein precursor	20
D	NP_540763.1 BMEI1846	-59	-47	TAAAGATTGATT	ExsF protein	21
D	NP_540809.1 BMEI1892	-290	-278	TAAACTATTGATA	hypothetical cytosolic protein (cysteine-rich)	22
R	NP_540900.1 BMEI1983	-366	-354	TAAACCATTGATT	spore-cortex-lytic enzyme prepeptide precursor	23
D	NP_541135.1 BMEI0158	-28	-16	TAACATATTGATT	FtcR	24
D	NP_541223.1 BMEI0246	-134	-122	TAAACTATTGATT	nitroreductase	25
R	NP_541224.1 BMEI0247	-144	-132	TAAGCTTTTGATT	exoenzymes regulatory protein AepA precursor	26
D	NP_541370.1 BMEI0392	-260	-248	TAATGCCTTGATT	transcription accessory protein (S1 RNA binding domain)	27
R	NP_541371.1 BMEI0393	-162	-150	TAATGCCTTGATT	ArsR family transcriptional regulator	28
D	NP_541408.1 BMEI0430	-260	-248	CAATATATTGATA	erythritol kinase	29
D	NP_541516.1 BMEI0538	-32	-20	CAACTGATTGATT	hypothetical protein	30
D	NP_541633.1 BMEI0655	-148	-136	CAATATATTGATT	alkaline phosphatase	31
D	NP_541683.1 BMEI0705	-313	-301	TAACCGATTGATT	hypothetical protein	32
R	NP_541698.1 BMEI0720	-169	-157	TAACCAGTTGATA	transcriptional regulator	33
D	NP_541712.1 BMEI0734	-155	-143	CAATACGTTGATA	periplasmic oligopeptide-binding protein precursor	34

sens	Gène	Start	End	Séquence	Nom du gène (KEGG)	
D	NP_541733.1 BMEI10755	-296	-284	TAATATGTTGATT	sugar-binding protein	35
R	NP_541734.1 BMEI10756	-50	-38	TAATATGTTGATT	N-acetylglucosamine kinase	36
D/R	NP_541782.1 BMEI10804	-23/-26	-11/-14	CAATCGATTGATT	transcriptional regulator, TetR family	37

☐ Gène flagellaire

☐ Protéine hypothétique

☐ Facteur transcriptionnel

ANNEXE III : FtcR box**Liste des gènes dont le promoteur possède une boîte de reconnaissance à FtcR**Séquence consensus utilisée : CGC(N₀₋₁)AAGN(A/T)T

Sens	Gène	Start	End	Séquence	Nom du gène (KEGG)	
D	BMEI0116	-347	-339	CGCAAGAAT	LysR family transcriptional regulator	1
D	BMEI0167	-164	-156	CGCAAGGTT	ammonium transporter	2
D	BMEI0197	-31	-23	CGCAAGGTT	lysostaphin	3
D	BMEI0343	-98	-89	CGCGAAGAAT	cell division protein FtsH	4
D	BMEI0410	-135	-127	CGCAAGATT	MerR family transcriptional regulator	5
D/R	BMEI0564	-108/-105	-100/-96	CGCAAGCTT/CGCGAAGCTT	DnaJ-like protein DjlA	6
D	BMEI0582	-163	-155	CGCAAGGTT	ddl; D-alanine--D-alanine ligase	7
D	BMEI0617	-159	-151	CGCAAGCAT	acetolactate synthase 3 catalytic subunit	8
D	BMEI0673	-230	-222	CGCAAGTTT	thiosulfate-binding protein precursor	9
D	BMEI0743	-172	-164	CGCAAGGAT	secE	10
D	BMEI0792	-65	-57	CGCAAGGTT	intracellular proteinase I	11
D	BMEI0793	-60	-51	CGCAAAGATT	protease	12
D	BMEI0883	-111	-103	CGCAAGGAT	multiple antibiotic resistance protein MarC	13
D	BMEI0937	-99	-90	CGCGAAGCTT	putative competence-damage protein	14
D	BMEI1012	-318	-310	CGCAAGGAT	integrase/recombinase	15
D	BMEI1122	-186	-178	CGCAAGATT	phosphoribosylaminoimidazole-succinocarboxamide synthase	16
D	BMEI1198	-99	-90	CGCTAAGATT	hypothetical protein	17
D	BMEI1225	-312	-303	CGCCAAGTTT	hypothetical protein	18
D	BMEI1434	-161	-153	CGCAAGCAT	hypothetical protein	19
D	BMEI1579	-54	-46	CGCAAGCTT	periplasmic mannitol-binding protein	20
D	BMEI1793	-193	-184	CGCGAAGAAT	putative protease IV	21
D	BMEI1800	-144	-135	CGCGAAGCTT	putative cytoplasmic protein	22
D	BMEI1890	-120	-112	CGCAAGTTT	transporter	23
D	BMEI1897	-202	-194	CGCAAGCAT	hypothetical protein	24
D	BMEI1934	-82	-74	CGCAAGGAT	periplasmic oligopeptide-binding protein precursor	25
D	BMEI2038	-44	-36	CGCAAGAAT	hypothetical protein	26
D	BMEI0011	-311	-303	CGCAAGAAT	transcriptional regulatory protein HydG	27
D	BMEI0117	-28	-20	CGCAAGCAT	hypothetical protein	28
D	BMEI0126	-191	-183	CGCAAGCTT	amino acid permease	29
D/R	BMEI0151	-34/-31	-26/-22	CGCAAGCTT/CGCGAAGCTT	fliF	30
D/R	BMEI0166	-146/-143	-138/-134	CGCAAGCTT/CGCGAAGCTT	fliA	31
D	BMEI0242	-146	-137	CGCGAAGCTT	aldehyde dehydrogenase	32
D	BMEI0252	-143	-135	CGCAAGCAT	mgsA	33
D	BMEI0350	-166	-157	CGCAAAGCAT	D-aminopeptidase	34
D	BMEI0444	-340	-332	CGCAAGCTT	hypothetical protein	35
D	BMEI0514	-25	-17	CGCAAGATT	3-ketoacyl-(acyl-carrier-protein) reductase	36
D/R	BMEI0708	-70/-67	-62/-59	CGCAAGCTT/CGCAAGCTT	YbaK/prolyl-tRNA synthetase family protein	37
D	BMEI0957	-81	-73	CGCAAGGAT	3-octaprenyl-4-hydroxybenzoate carboxy-lyase	38
D	BMEI0976	-215	-207	CGCAAGGAT	ABC transporter ATP-binding protein	39
D	BMEI1089	-59	-51	CGCAAGCTT	flgB	40

- ☐ Gène flagellaire
- ☐ Protéine hypothétique
- ☐ Facteur transcriptionnel

ANNEXE IV : CtrA box**Liste des gènes dont le promoteur possède une boîte de reconnaissance à CtrA**

Séquence consensus utilisée : TTAAC (sans substitution)

Sens	Gène	Start	End	Nom du gène	N°
R	NP_541135.1 BMEI10158	-192	-188	ftcR	1
R	NP_541135.1 BMEI10158	-113	-109	ftcR	2
D	NP_541143.1 BMEI10166	-45	-41	flhA	3
D	NP_541147.1 BMEI10170	-137	-133	flgJ	4
D	NP_542067.1 BMEI1089	-28	-24	flgB	5
R	NP_542067.1 BMEI1089	-279	-275	flgB	6
R	NP_542067.1 BMEI1089	-29	-25	flgB	7
R	NP_542095.1 BMEI1117	-17	-13	tetR	8

Séquence consensus utilisée : TTAACCAT (avec une substitution d'un nucléotide possible)

Sens	Gène	Start	End	Nom du gène	N°
D	NP_542067.1 flgB	-28	-21	flgB	9

Séquence consensus utilisée : TTAAN{7}TTAAC (avec une substitution d'un nucléotide possible)

Sens	Gène	Start	End	Nom du gène	
R	NP_541135.1 BMEI10158	-192	-177	ftcR	10
D	NP_541147.1 BMEI10170	-148	-133	flgJ	11
R	NP_542067.1 BMEI1089	-29	-14	flgB	12
D	NP_542080.1 BMEI11102	-305	-290	Hypothetical protein	13

ANNEXE V : Fretin *et al.* 2005

Permission de diffusion accordée par © Wiley-Blackwell.

Cellular Microbiology (2005) 7(5), 687–698

doi:10.1111/j.1462-5822.2005.00502.x

The sheathed flagellum of *Brucella melitensis* is involved in persistence in a murine model of infection

D. Fretin,^{1†} A. Fauconnier,² S. Köhler,³ S. Halling,⁴ S. Léonard,¹ C. Nijskens,¹ J. Ferooz,¹ P. Lestrade,¹ R.-M. Delrue,¹ I. Danese,⁵ J. Vandenhoute,¹ A. Tibor,¹ X. DeBolle¹ and J.-J. Letesson^{1*}

¹Unité de Recherche en Biologie Moléculaire, University of Namur, Namur, Belgium.

²Service de Genetique Appliquée, Institut de Biologie et de Médecine Moleculaires, Université Libre de Bruxelles, Belgium.

³Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U-431 (INSERM U-431) Université Montpellier II, France.

⁴Bacterial Diseases of Livestock Unit, National Animal Disease Center, Agricultural Research Service, United States Department of Agriculture, Ames, USA.

⁵Centre d'Etude et de Recherches Vétérinaires et Agronomiques, Brussels, Belgium.

Summary

Persistence infection is the keystone of the ruminant and human diseases called brucellosis and Malta fever, respectively, and is linked to the intracellular tropism of *Brucella* spp. While described as non-motile, *Brucella* spp. have all the genes except the chemotactic system, necessary to assemble a functional flagellum. We undertook to determine whether these genes are expressed and are playing a role in some step of the disease process. We demonstrated that in the early log phase of a growth curve in 2YT nutrient broth, *Brucella melitensis* expresses genes corresponding to the basal (MS ring) and the distal (hook and filament) parts of the flagellar apparatus. Under these conditions, a polar and sheathed flagellar structure is visible by transmission electron microscopy (TEM). We evaluated the effect of mutations in flagellar genes of *B. melitensis* encoding various parts of the structure, MS ring, P ring, motor protein, secretion apparatus, hook and filament. None of these mutants gave a discernible phenotype as compared with the wild-type strain in cellular models of infection. In contrast, all these mutants were unable to establish a chronic infection in mice infected via

the intraperitoneal route, raising the question of the biological role(s) of this flagellar appendage.

Introduction

Brucella organisms are Gram-negative coccobacilli that cause brucellosis: a zoonotic disease that has a significant impact on both animal and human health worldwide (Alton *et al.*, 1975). These bacteria are exquisitely well adapted to survival and replication inside eukaryotic cells which is one of the basis for the well-known but still poorly explained chronicity of *Brucella* infection (Ficht, 2003). The genus *Brucella* is a member of the alpha subclass of *Proteobacteria* and belongs to the redefined family Rhizobiaceae that contains bacteria such as *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Agrobacterium* and *Ochrobactrum* species (Yanagi and Yamasato, 1993). In contrast to most Rhizobiaceae, *Brucella* have long been described as non-motile (Alton *et al.*, 1975). Nevertheless, open reading frames (ORFs) encoding homologues of several flagellar-related proteins were described in *Brucella abortus* (Halling, 1998). Even though the genome sequences of *Brucella melitensis* and *Brucella suis* revealed the presence of three clusters of flagellar genes (DelVecchio *et al.*, 2002; Paulsen *et al.*, 2002), these genes were considered to be cryptic remnants (Moreno and Moriyon, 2002) because some were truncated and others encoding crucial components of the putative flagellar apparatus (e.g. P ring, L ring) were described as missing (DelVecchio *et al.*, 2002).

Surprisingly, a flagellar gene was identified in a signature-tagged mutagenesis (STM) screen of *B. melitensis* 16M performed in our laboratory using a mouse infection model (Lestrade *et al.*, 2000). One of the attenuated mutants has a transposon insertion in a gene encoding a protein similar to FlIF, the monomer of the MS ring, a very basal part of the flagellar apparatus (Lestrade *et al.*, 2003). The attenuation of this mutant leads us to hypothesize that the flagellar genes are expressed under some specific conditions encountered during the infectious cycle.

Up to now, only a few major virulence factors of *Brucella* have been identified, i.e. the O-chain of the lipopolysaccharide (LPS) (Godfroid *et al.*, 1998), the Omp25 (Jubier-Maurin *et al.*, 2001), the type IV secretion system (T4SS) (Boschiroli *et al.*, 2002) and the BvrS–BvrR two-component system that seems to be involved in the homeostasis of the outer membrane (Guzman-Verri *et al.*,

Received 30 September, 2004; revised 1 December, 2004; accepted 2 December, 2004. *For correspondence. E-mail: jean-jacques.letesson@fundp.ac.be; Tel. (+32) 81 72 44 02; Fax (+32) 81 72 44 20. †Present address: Centre d'Etude et de Recherches Vétérinaires et Agronomiques, Brussels, Belgium.

688 D. Fretin et al.

2002). These factors are mostly localized at the bacterial surface and are important in the interaction of *Brucella* with its target eukaryotic cell and, for the LPS and the Omp25, with the host immune system (Forestier *et al.*, 2000; Jubier-Maurin *et al.*, 2001). Other steps of the *Brucella* infectious process are also only partially understood, such as: adhesion, invasion, escape from infected cells, modulation of the immune response probably contributing to the persistence inside the host. These types of interactions with the host have often been linked to the expression of functional flagella in both pathogenic and symbiotic bacteria (Josenhans and Suerbaum, 2002). Moreover, the flagellar system, known to be phylogenetically related to the type III secretion apparatus (T3SS) (Blocker *et al.*, 2003), has been shown to be involved in virulence factor secretion (Young *et al.*, 1999; Ghelardi *et al.*, 2002; Song *et al.*, 2004).

We report here that *B. melitensis* in the early log phase of a growth curve in 2YT broth expressed genes corresponding to the basal (MS ring) and the distal (hook and filament) components of the flagellar apparatus. Under these conditions, a complete polar flagellar structure surrounded by a LPS bearing sheath is visible by transmission electron microscopy (TEM). We evaluated the effect of mutation of several flagellar genes of *B. melitensis* encoding various parts of the flagellar structure (MS ring, P ring, motor protein, secretion apparatus, hook, filament). None of these mutants gave a discernible phenotype when compared with the wild-type (WT) strain in cellular models of infection. In contrast, all these mutants were unable to persist in a murine intraperitoneal model of infection. Finally, we put forward hypothesis about the biological function(s) of *Brucella* flagellar apparatus. This apparatus richly deserves further attention as, in the very least, it appears involved in the persistence of the infection.

Results

Brucella melitensis and *B. suis* were devoid of chemotactic genes but possessed all the genes to build a flagellum and to make it rotate

The availability of the *B. melitensis* 16M and *B. suis* 1330 genome sequences (DelVecchio *et al.*, 2002; Paulsen *et al.*, 2002) allowed us to draw up an inventory of the flagellar genes. A comparison of the three *Brucella* flagellar clusters with the unique cluster of structural flagellar genes from both *Sinorhizobium meliloti* and *Mesorhizobium loti* (Kaneko *et al.* 2000a,b; Barnett *et al.*, 2001; Capela *et al.*, 2001; Finan *et al.*, 2001; Galibert *et al.*, 2001) revealed extensive gene synteny and gene names have been assigned by similarity to *S. meliloti* homologues (Sourjik *et al.*, 1998; Galibert *et al.*, 2001). We identified 31 ORFs encoding flagellar and motor proteins

distributed in three clusters on the small chromosome. Two coding sequences (CDS), namely *fliF* and *flhA*, are interrupted by a UAG (amber) stop codon in the *B. melitensis* genome (at position 243 for *fliF*, encoding the monomer of the MS ring and at position 298 for *flhA*, encoding a component of the export apparatus). These premature stop codons, reported in the published *B. melitensis* genome, were validated by sequencing (Table 1). No genes for chemotactic receptors or transducers were detected in the *B. melitensis* genome (DelVecchio *et al.*, 2002), but, in contradiction with previous claims, all the structural genes needed to assemble and to move a flagellum were present.

The expression of Brucella flagellar genes, proteins or apparatus was growth phase dependent

The attenuated phenotype of a transposition mutant (called 9C6) disrupted in the gene encoding the MS ring (*fliF*) (Lestrade *et al.*, 2003) prompted us to determine whether this gene is actually expressed under laboratory conditions. When *B. melitensis* 16M harbouring a *pfliF-lacZ* translational fusion on a plasmid is grown in 2YT broth, the putative *fliF* promoter is transiently induced during the early exponential phase as measured by a β -galactosidase assay (Fig. 1A). Usually, the assembly of a flagellar structure from the cytoplasmic membrane outward is a sequential process facilitated by a hierarchy of expression by which distal components are synthesized only after proper assembly of proximal substructures (for review, see Aldridge and Hughes, 2002; Macnab, 2003; Soutourina and Bertin, 2003). Having demonstrated the expression of the basal part of a putative flagellar apparatus (i.e. the MS ring), we undertook to determine whether the terminal parts (i.e. the hook or the flagellin) were also produced under similar conditions. To this end, a Western blot (WB) analysis was performed on whole-cell extracts from *B. melitensis* pellets harvested along a growth curve of another culture. Specific antisera (see *Experimental procedures*) to FlgE and to FlhC allowed us to visualize the expression of both the hook (FlgE) and the flagellin (FlhC) monomers at the onset of the exponential phase (after 4 h, 8 h and 12 h of culture) (Fig. 1B). These two proteins were not detected at later time points which is in agreement with the pattern of expression of the *fliF* promoter.

The detection of both the hook monomer and the flagellin protein made it seem likely that a complete flagellar apparatus was indeed assembled. By TEM of negatively stained *B. melitensis* cells harvested from a early log phase culture, a seemingly polar flagellar structure was observed (Fig. 2A and B). Immunogold labelling of *Brucella* smooth lipopolysaccharide (S-LPS) was performed on similar samples to confirm the bacterial genus and

Table 1. Predicted CDS (pCDS) identified in the three flagellar loci of *B. melitensis* 16M.

pCDS number	Intergenic region length downstream the pCDS ^a	Name ^b	E-value of <i>E. coli</i> homologue	E-value of <i>S. meliloti</i> homologue	Predicted function
Locus I					
BMEII0150	203	<i>fliC</i>	1 ^e -9	2 ^e -48	Flagellin
BMEII0151-0152 ^c	3	<i>fliF</i> (1 and 2)	2 ^e -26/7 ^e -11	3 ^e -62/3 ^e -43	MS ring monomer
BMEII0153	-3	HP	^d	9 ^e -14	NA
BMEII0154	-3	<i>motB</i>	2 ^e -16	6 ^e -71	Motor
BMEII0155	-3	<i>motC</i>	^d	8 ^e -39	Motor
BMEII0156	8	<i>motD</i>	^d	5 ^e -6	Motor
BMEII0157	328	HP	^d	1 ^e -64	NA
BMEII0158	411	<i>ftcR</i>	^d	1 ^e -76	Two-component response regulator
BMEII0159	124	<i>flgE</i>	1 ^e -38	7 ^e -88	Hook monomer
BMEII0160	5	<i>flgK</i>	3 ^e -12	5 ^e -84	Hook-associated protein
BMEII0161	131	<i>flgL</i>	7 ^e -3	1 ^e -50	Hook-associated protein
BMEII0162	1	<i>fliA</i>	^d	3 ^e -27	Flagellin biosynthesis regulator
BMEII0163	-4	<i>fliB</i>	^d	9 ^e -39	Flagellin biosynthesis repressor
BMEII0164	11	<i>flgD</i>	1 ^e -8	2 ^e -31	Hook-capping protein
BMEII0165	160	<i>fliQ</i>	1 ^e -5	6 ^e -25	Export apparatus
BMEII0166-167 ^c	15	<i>fliH</i> (1 and 2)	3 ^e -19/1 ^e -93	3 ^e -32/0.0	Export apparatus
BMEII0168	NR	<i>fliR</i>	5 ^e -18	1 ^e -50	Export apparatus
Locus II					
BMEII1080	-4	<i>fliP</i>	3 ^e -53	1 ^e -83	Export apparatus
BMEII1081	12	<i>fliL</i>	^d	1 ^e -15	Basal-body-associated protein
BMEII1082	-4	<i>flgH</i>	7 ^e -14	1 ^e -47	L ring monomer
BMEII1083	-4	<i>motE</i>	^d	4 ^e -32	Motor
BMEII1084	295	<i>flgI</i>	2 ^e -75	1 ^e -117	P ring monomer
BMEII1085	62	<i>flgA</i>	<0.01	1 ^e -25	Basal-body P ring biosynthesis protein
BMEII1086	85	<i>flgG</i>	1 ^e -54	3 ^e -98	Basal-body rod protein
BMEII1087	-2	<i>fliE</i>	<0.01	2 ^e -18	Hook basal-body complex protein
BMEII1088	2	<i>flgG</i>	8 ^e -23	8 ^e -44	Basal-body rod protein
BMEII1089	NR	<i>flgB</i>	<0.01	1 ^e -24	Basal-body rod protein
Locus III					
BMEII1105	-30	<i>fliI</i>	5 ^e -64	1 ^e -111	Flagellum ATP synthase
BMEII1106	205	HP	—	—	NA
BMEII1107	-1	<i>flgF</i>	2 ^e -09	1 ^e -38	Basal-body rod protein
BMEII1108	46	HP	^d	6 ^e -69	NA
BMEII1109	-1	<i>motA</i>	7 ^e -58	1 ^e -109	Motor
BMEII1110	-20	<i>fliM</i>	^d	1 ^e -12	Motor switch
BMEII1111	23	HP	—	—	NA
BMEII1112	16	<i>fliN</i>	1 ^e -15	1 ^e -23	Motor switch
BMEII1113	290	<i>fliG</i>	1 ^e -08	1 ^e -23	Motor switch
BMEII1114	NR	<i>fliB</i>	3 ^e -32	3 ^e -76	Export apparatus

a. Intergenic regions smaller than 40 nucleotides are expected to be part of an operon (Salgado *et al.*, 2000)

b. In agreement with the name given for flagellar genes of *E. coli*, *Bacillus subtilis* or *S. meliloti*.

c. Indicate the CDS with a premature stop codon. The numbers 1 and 2 refer, respectively, to the N- and C-terminal parts of complete homologous genes.

d. Conserved in alphaproteobacteria.

BMEII1111 and BMEII0169 could be badly predicted pCDS.

HP, hypothetical protein; NA, not available; NR, non-relevant; —, not conserved.

species; the gold-labelling was detected not only on the cell surface but also on the flagellar structure, showing that the flagellum of *Brucella* is sheathed by an outer membrane (Fig. 2C–E) as also described for *Vibrio cholerae*, *Helicobacter* sp. and *Bdellovibrio* sp. (Thomashow and Rittenberg, 1985; Fuerst and Perry, 1988; Hernandez and Monge-Najera, 1994).

The *fliF* promoter was induced inside eukaryotic cells

We use a *B. melitensis* 16M strain bearing the pBBpflif-gfp plasmid to infect eukaryotic cells in order to determine whether the *pflif* promoter was expressed intracellularly.

While no fluorescence was detectable for bacteria grown on bacteriological solid medium, green fluorescent protein (GFP) fluorescence was detected at 24 and 48 h after HeLa cells infection (Fig. 3A and B). At 24 h after infection in HeLa cells, most of the intracellular *Brucella* labelled with anti-LPS antibodies display *pflif* expression (Fig. 3C). The *pflif* promoter was also induced in bovine macrophage cell line (data not shown).

An independent confirmation came from the screen of a library of *B. suis* containing transcriptional fusions of chromosomal DNA to *gfp*. This library was screened to identify *B. suis* promoters strongly induced inside J774 murine macrophages (Kohler *et al.*, 1999). Among new

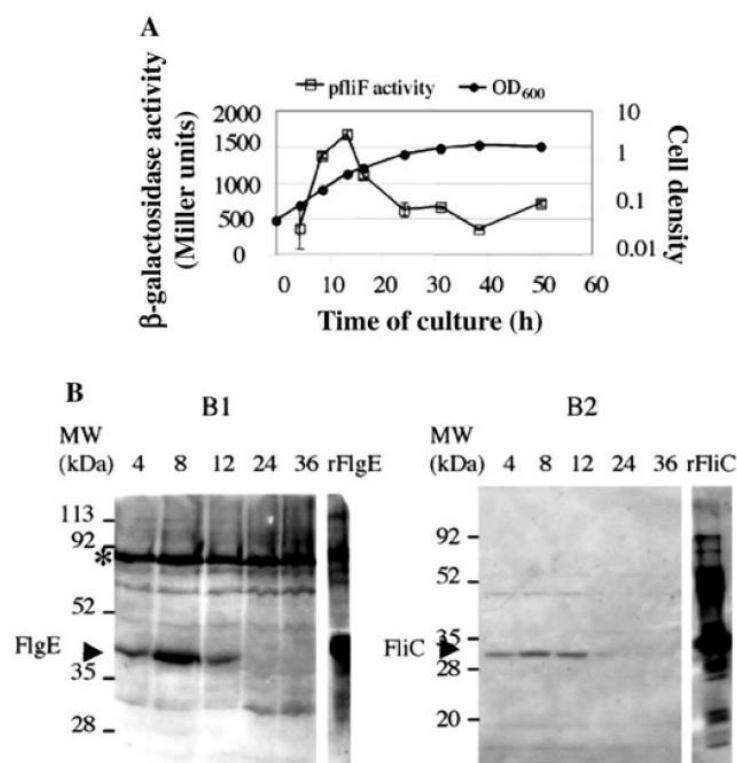


Fig. 1. A. *Brucella* bearing a plasmid with the translational fusion *pflif::lacZ* was grown in 2YT nutrient broth. The activity of the *fliF* promoter was followed using β -galactosidase assay.

Black circles: optical density at 600 nm; empty squares: β -galactosidase activity expressed as mean \pm SD of three replicates. This figure is representative of several independent cultures; in all cases the optimal expression was reached around OD_{600} of 0.2.

B. FliC and FlgE production in *Brucella* harvested at 4, 8, 12, 24 and 36 h of growth in 2YT nutrient broth evaluated by SDS-12% PAGE of cell lysates, followed by Western blotting with FlgE-specific (B1) or with FliC-specific (B2) antisera respectively. Omp1 (89 kDa) detected by an anti-Omp1 monoclonal antibody was used as loading control (B1) and is indicated by a star. Recombinant proteins (rFlgE and rFliC) were run as positive controls. The calculated molecular mass (kDa) of FlgE and rFlgE is: 41 and 46. The calculated molecular mass (kDa) of FliC and rFliC is: 29 and 32.

clones fluorescing exclusively intracellularly, a clone containing a DNA fragment corresponding to the 526 bp sequence located upstream from the *fliF* ORF, and the 129 bp 5' end of this ORF was identified (S. Köhler, unpublished results).

No attenuation could be demonstrated for *Brucella* flagellar mutants in cellular models of infection

In order to evaluate the contribution of the flagellar genes

to *Brucella* virulence, we constructed mutants in genes encoding flagellar proteins involved in different structural components. As targets for mutation, we chose genes coding for homologues of basal body components similar to T3SS (MS ring monomer: FliF and flagellar export apparatus: FliH), P ring monomer (FliI), the motor protein (MotB), the hook monomer (FlgE) and the flagellin monomer (FliC), and these mutants were compared with the WT strain for their ability to invade and replicate inside cells as described previously (Delrue *et al.*, 2001).

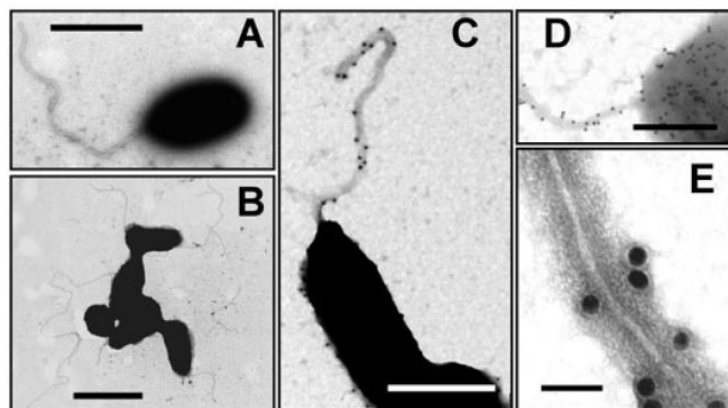


Fig. 2. Transmission electron microscopy of *Brucella melitensis* cells harvested in early log phase.

A–D. Negative staining with uranyl acetate showing a polar flagella; bars = 1 μ m.

C–E. Immunogold labelling of *Brucella* S-LPS illustrating the sheathed nature of *B. melitensis* 16M flagellum. (C and D) Bar = 0.5 μ m. (E) Magnification of the sheathed filament. The core filament is clearly seen surrounded by the sheath. Bar = 50 nm.

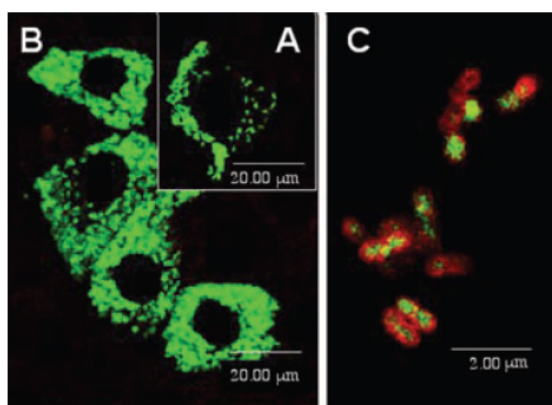


Fig. 3. Expression of GFP from the *fliF* promoter in HeLa cell. HeLa cells were infected at a ratio of 300 bacteria per cell with *B. melitensis* 16M harbouring pBBp*fliF*-gfp. GFP production was monitored by fluorescence microscopy after 24 h (A) and (C) or 48 h (B) of infection. In (C), the GFP expression appears in yellow because *Brucella* were immunostained in red with a monoclonal antibody raised against LPS O-chain and detected using Alexia 568-conjugated anti-mouse IgG.

Regardless of the cellular models tested and the conditions used for the cellular infection (see *Experimental procedures*), no clear difference between the WT and the mutants was evident when internalization or intracellular replication was examined (data not shown). In contrast to a newly constructed MS ring (*fliF*) mutant, the transpositional *fliF* (9C6) mutant was consistently attenuated (data not shown). This discrepancy is probably linked to an additional unidentified mutation in the *B. melitensis* strain bearing the transpositional 9C6 mutation as the WT *B. melitensis* strains used in this study and in the paper describing the 9C6 mutant (Lestrade *et al.*, 2003) are not of the same origin.

The lack of attenuation of the flagellar mutants in cellular models of infection could either mean that the flagellar genes, while expressed intracellularly, are not needed to infect and replicate inside laboratory cell lines or that the role of these genes are not apparent using these kinds of assays.

Being unable to assign a role to the flagellar structure using <<*in vitro*>> models of infection and knowing that these models are only partial mimics of the natural infectious process, we used mice as a classical animal model for *Brucella* infection.

All *Brucella* flagellar mutants were attenuated in mice at 4 weeks after infection

Groups of BALB/c mice were infected via the intraperitoneal (IP) route either by the WT *B. melitensis* 16M strain or by flagellar mutants corresponding to the MS ring (*fliF*), the P ring (*flgI*) and the filament (*fliC*), encompassing all

B. melitensis flagellum is a virulence factor in mice 691

three structural levels of the flagellum. The mice were sacrificed 1, 4, 8 and 12 weeks after infection to determine bacterial counts in the spleen. One week after infection, none of the mutants was significantly attenuated as compared with the virulent parental *Brucella* strain (Fig. 4A). On the contrary, as the infection progressed, the mean spleen counts from mice infected with mutants *fliF*, *flgI* and *fliC* were significantly lower than the number of bacteria in the spleen of mice infected with the WT strain. Most of the mice cleared the flagellar mutants 12 weeks after infection. As a confirmation, new groups of mice were infected with *flhA*, *motB*, *flgE* and *fliF* mutants and mice were sacrificed 4 weeks after infection. At this time, all the mutants were attenuated to the same extent (Fig. 4B). Altogether, these data indicated that *B. melitensis* requires the expression of a flagellar structure to cause a persistent disease in the murine model.

Discussion

Brucella is described as non-motile (Alton *et al.*, 1975).

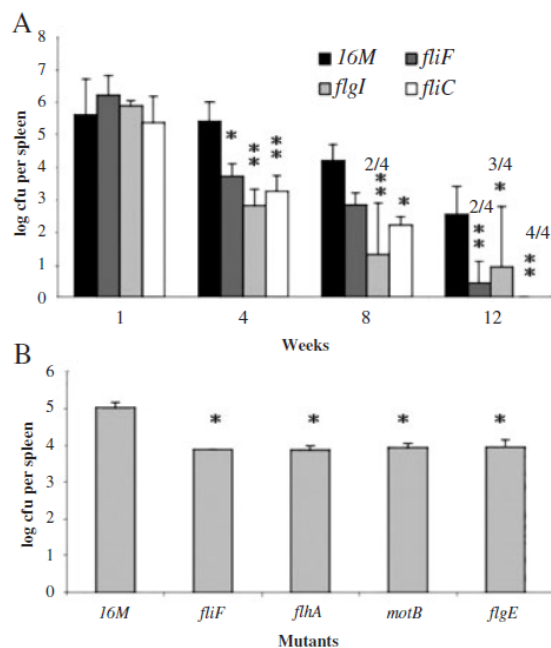


Fig. 4. Virulence of *B. melitensis* 16M Nalr and flagellar mutant strains in BALB/c mice. Mice were infected by intraperitoneal injection. Values are means (log number of cfu per spleen) \pm standard deviations (error bars) ($n = 4$).

A. Mice infected with the 16M strain or the *fliF*, *flgI* and *fliC* mutants and sacrificed at 1, 4, 8 and 12 weeks after infection. The ratios above the columns indicate the proportion of mice that cleared the infection at the indicated time.

B. Mice infected with the 16M strain or the *fliF*, *flhA*, *motB* and *flgE* mutants and sacrificed at 4 weeks after infection.

*Significant ($P < 0.05$), **Highly significant ($P < 0.01$).

The lack of demonstrated motility, the presence of truncated flagellar genes and the absence of chemotactic genes support the view that the flagellar genes identified in the genome of various *Brucella* species are cryptic remnants (DelVecchio *et al.*, 2002; Abdallah *et al.*, 2003). Along with the lack of resident plasmids in *Brucella*, the lack of functional flagella was taken as additional evidence of the inability of *Brucella* to survive or replicate for prolonged periods of time in the environment, leading to its description as a <<facultatively extracellular, intracellular pathogen>> (Moreno and Moriyon, 2002). Here we established unambiguously that *B. melitensis* was able to build up a complete flagellar apparatus which appeared to be polar and sheathed, at least *in vitro*. The synthesis and assembly of this structure was tightly regulated both *in vitro* and *in vivo* and appears essential for the long-term survival of *Brucella* in mice.

By itself, the presence of flagellar genes, even a complete set of them, in a pathogenic bacterium previously considered as non-motile is not unique. Other non-motile pathogens (e.g. *Shigella flexnerii* and *Aeromonas salmonicida*) were shown to have flagellar genes and to assemble a flagellum, although rarely, under strictly defined conditions (Tominaga *et al.*, 1994; Umelo and Trust, 1997).

Two points are very surprising with *Brucella*. First, as opposed to the above-mentioned non-motile pathogens, *Brucella* needed its flagellum for a normal infectious cycle: actually, the inability to assemble a complete flagellum, even the very distal component, led to a severe attenuation of the mutated *Brucella* in a mouse model of infection.

Second, to our knowledge, it is the first time that a functional flagellar apparatus is described without the existence of either chemotactic receptors or signal transducers. These two peculiarities make the biological function(s) of this structure in *Brucella* very intriguing.

Brucella melitensis has all the genes needed for and is effectively able to construct a complete flagellar structure

Taking into account the known departure of rhizobial flagellum from the enterobacterial flagellar paradigm (Scharf *et al.*, 2001; Scharf and Schmitt, 2002), the genomic analysis uncovered 26 structural genes and five genes involved in the motor function in the *B. melitensis* genome (Table 1). Homologues of several ORFs strictly typical of *Rhizobiaceae* flagellar systems were present: (i) homologues of the genes encoding three novel motility proteins, MotC, MotD and MotE, that are essential for the control of flagellar rotary speed in *S. meliloti* (Platzer *et al.*, 1997; Eggenhofer *et al.*, 2004), (ii) an homologue of *flbT* encoding a post-transcriptional regulator of flagellin synthesis in *Caulobacter crescentus* (Anderson and Gober, 2000) and

(iii) several ORFs of unknown function conserved in *S. meliloti* (Sourjik *et al.*, 1998) (see Table 1).

The available set of genes is sufficient to build a complete flagellar apparatus. This was demonstrated not only by the co-ordinate expression of both the *fliF* gene and of the FlgE and FlgC proteins when *Brucella* was grown to early log phase in 2YT broth, but also, and much more convincingly, by the TEM observation of a flagellar structure. *In vitro*, the expression of the flagellum is transient (see Fig. 1). Actually, the flagellar proteins detected by WB in the early course of the growth curve could be assumed either to progressively disappear diluted by the increasing number of non-flagellated newly formed cells in the growing population or to be degraded or ejected from the cells. The hook protein and the flagellin were no more detected in samples harvested at 24 h (OD₆₀₀: 1.2) while there gave strong bands from 12 h old cells (OD₆₀₀: 0.49). During this period of time the OD increased less than threefold meaning a maximum threefold dilution of pre-existing proteins which should still be detected at least faintly. Concomitantly with the disparition of the FlgE band we observed also an increase of a lower molecular weight (MW) band which could be a degradation product (see Fig. 1). The total disappearance of these proteins probably suggests that a more active process is taking part in this process as it has been observed in other bacteria. The flagellar components of *S. meliloti* also disappear rapidly *in vitro* (B. Scharf, pers. comm.). This is also reminiscent of the *C. crescentus* story where the MS ring, composed of FlgF multimers, is subjected to proteolysis leading to ejection of the flagellum (Jenal and Shapiro, 1996). Actually, both *Brucella* and *Sinorhizobium* share with *Caulobacter* numerous aspects of the cell cycle including an asymmetrical division and proteins partners of the phosphorelay controlling the cycle and expression of cell appendages (Hallez *et al.*, 2004). In addition, the sheathed flagellum of *Bdellovibrio* spp. is dropped before prey invasion (Thomashow and Cotter, 1992). Several points make the flagellum of *Brucella* quite peculiar among *Rhizobiaceae* or even alphaproteobacteria. As opposed to the majority of bacterial species which have flagellar filaments made from a single protein (flagellin) (Armitage, 2004), the alphaproteobacteria (e.g. *Agrobacterium tumefaciens*, *C. crescentus*, *S. meliloti*, *Rhizobium lupini*, *Rhodobacter sphaeroides*) have various flagellins as subunits to construct a complex rigid flagellum (Scharf *et al.*, 2001; Armitage, 2004). It is noteworthy that *Brucella* sp. had only one gene (*fliC*) encoding the filament. Although the *Rhizobiaceae* have mostly peritrichous flagella (Armitage, 2004), *Brucella*, much more like *C. crescentus*, appears to build a polar (monotrichous) flagellum, at least in the condition tested. Finally, as demonstrated by the immunogold labelling with anti-LPS O-chain monoclonal antibody (mAb), *Brucella* has a

sheathed flagellum similar to that described in *V. cholerae* (Fuerst and Perry, 1988), *Bdellovibrio* sp. and *Helicobacter* sp. (Thomashow and Rittenberg, 1985; Hernandez and Monge-Najera, 1994). This is the first description of synthesis of a sheathed flagellum in alphaproteobacteria.

Last, but not least, a full-length flagellar structure is assembled, even if the *fliF* and *flhA* CDS are interrupted by a UAG (amber) stop codon in the *B. melitensis* genome (see Table 1), which are essential for the flagellum biosynthesis and assembly. These interrupted CDS must therefore produce functional products. We hypothesize that either truncated portions of *fliF* and *flhA* are expressed and functional, or there is some degree of suppression of the amber codons allowing translation of full-length FlIF and FlHA products. Note that the corresponding codons in the *B. suis* homologous genes correspond to CAG (encoding a Gln residue) for the *fliF* gene and GAG (encoding a Glu residue) for the *flhA* gene.

The complete flagellar structure of B. melitensis is strictly required for the long-term survival of Brucella in mice

The only insight to the biological function(s) of the *Brucella*'s flagellar apparatus has been gained by comparing the residual virulence of the WT strain and flagellar mutants after an IP inoculation in mice.

From these experiments, there are three major observations: first, no attenuation [in terms of colony-forming units (cfu) per spleen] was recorded after 1 week of infection; second, the mean spleen count of the mutants is nevertheless reduced after 4 weeks and later times; and third, all the mutants behaved very similarly.

Injected by IP in mice, *B. melitensis* reaches a maximal splenic count at 5–6 days after the infection, afterwards bacterial numbers stabilize over the next 4–5 weeks and then decrease slowly. The observation that, no matter what mutant was tested, there was no reduction in the splenic count observed after 1 week of infection is indicative that, at least via the IP route, *B. melitensis* did not need its flagellar apparatus either for the initial capture event, for its dissemination to the target organs or even for its intracellular replication process in these infected organs where *Brucella* are found intracellularly within macrophages (Meador *et al.*, 1986).

This lack of detectable effect during the *in vivo* replicative phase of the infection is consistent with the failure to identify any defect of the flagellar mutants using *in vitro* cellular models of infection. These data are also in agreement with the fact that, despite the large number of strains tested, no flagellar genes have been identified in random large screens for attenuated *Brucella* mutants either *in vitro* (Foulongne *et al.*, 2000; Delrue *et al.*, 2001; Kohler *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2003) or in the acute phase of infection in mice (Lestrade *et al.*, 2000). The lack of detect-

B. melitensis flagellum is a virulence factor in mice 693

able attenuation in cellular models of infection or after 1 week of infection in mice as compared with the WT strain and the fact that all the mutants tested demonstrated the same behaviour make very unlikely a pleiotropic effect of the mutations on the membrane integrity which could explain the reduced virulence at 4 weeks in the mouse model.

While the flagellar genes were not involved in the *Brucella* intracellular trafficking towards its replicative niche, the *fliF* gene was induced intracellularly. The intracellular expression of flagellar genes has to serve some crucial and currently unknown function that is worthy of the high energy costs demanded in the synthesis and assembly of this macromolecular structure. It probably means that the flagellar synthesis cascade is initiated intracellularly and could be essential at some later point of the infectious process as demonstrated for *Legionella pneumophila* (Byrne and Swanson, 1998). This intracellular pathogen and *Brucella* sp. share some virulence traits. For both of them a T4SS is necessary for their access to the replicative vacuole and their replicative vacuole is also endoplasmic reticulum (ER) derived (Scott *et al.*, 2003). *Legionella*'s flagellum appears to be involved in the escape from the infected cells. The models we used for *Brucella* probably do not allow us to demonstrate an effect either *in vitro* or in an acute IP infection model in mice. Other inoculation routes in mice or the use of other experimental species would probably be more informative as indicated by the identification of an attenuated *B. melitensis* strain mutated in the *flgF* gene (BMEII1107: flagellar basal-body rod) during a STM screen in goats infected via a subcutaneous route (M. Zygmunt, pers. comm.).

Of course, all the above comments on the behaviour of the mutants in the initial steps of the infectious process in mice including their lack of attenuation after 1 week and the parallelism we established with their lack of attenuation in cellular models of infection assume that cellular infection *in vitro* mimics at least partially the initial steps of the *in vivo* infection. Alternatively, it could also be that *in vivo* behaviour cannot be extrapolated from data gained in cellular models of infection. Nevertheless, some other mechanisms must be evoked to explain the attenuation evidenced only after 4 weeks and later time points. The chronicity of the infection with intracellular bacteria like *Mycobacterium tuberculosis* or *Brucella* sp. results from the combined effect of metabolic adaptations of the bacteria (Weber *et al.*, 2000; Lorenz and Fink, 2002; Ficht, 2003) and modulation of the host-specific immune response (Forestier *et al.*, 2000; Jacobs *et al.*, 2000). We propose that the flagellum of *Brucella* is used to somehow subvert the specific immune response which could be more efficient when the flagellum is lacking. Considering the known immunomodulatory role of flagellin via TLR5 signalling the putative *in vivo* role of this *Brucella* patho-

gen-associated molecular pattern (PAMP) will certainly deserve further attention so as the role of the sheath which was suggested preventing the release of flagellin monomers into the surrounding environment (Ramos *et al.*, 2004).

Despite the fact that the exact reason(s) of this late attenuation are not understood, the observation that the flagellar mutants are not cleared during the early course of the infection in mice but are nevertheless cleared at later time points makes them potential valuable vaccine candidates, as also suggested by preliminary results (J. Godfroid, pers. comm.).

The observation that the *fliC* mutant (lacking only the filament of the flagellum) has the same phenotype as other deeper flagellar mutants (i.e. *flgE*, *flgI*, *fliF* mutants) is a strong indication that even *in vivo* a complete flagellar structure is built and needed for a full function.

The above-reported data are important cues indicating that the *B. melitensis* flagellar genes do not encode a *bona fide* T3SS as it has been suggested previously (Abdallah *et al.*, 2003; Karlin *et al.*, 2003). However, as exemplified by the case of *Yersinia* (Young *et al.*, 1999) or *Campylobacter* (Song *et al.*, 2004), an involvement of the *Brucella* flagellar apparatus in the secretion of virulence factor(s) cannot be ruled out.

What signifies the absence of a chemotactic system?

Finally, one of the most striking observations with regard to the *Brucella* flagellar genes is the absence of genes encoding both membrane chemoreceptors and proteins of the signal transduction pathway to the flagellar motor. Actually, an homologous set of proteins (chemoreceptors, CheW, CheY, CheA, CheB and CheR) governs chemotaxis in all motile species of Bacteria or even Archaea whose genome is complete or available (Szurmant and Ordal, 2004). This pathway leads either to the switching of the sense of rotation, from right-handed to left-handed and vice versa, according to the enterobacterial paradigm, or to the modulation of the rotary speed as described in *S. meliloti*. Moreover, the genome of several alphaproteobacteria contain multiple homologues of chemotactic genes distributed in several regions (Hauwaerts *et al.*, 2002) and the signalling pathway is more elaborate and more complex than that of the classical pathway found in *Escherichia coli*. The absence of such a system in *Brucella*, as an actual exception among bacteria with a functional flagellar apparatus, raises the intriguing question whether all or part of its biological function(s) involves movement and, hence, a rotary process.

Accessory roles described for other flagellated bacteria (e.g. adhesion, toxin secretion) (Young *et al.*, 1999) are always in addition to the motility <<per se>> function (Josenhans and Suerbaum, 2002). So, except for rotation

and movement there is no need for a complete complex structure. Actually the fact that a motor mutant (*motB*) has the same phenotype in mice as structural mutants is indicative that rotation could be involved.

The chemotactic signalling pathway is usually involved in controlling the directionality of cell movements in response to environmental stimuli. At least for some intracellular pathogens, could it be that movement is more important than direction? If *Brucella* is indeed rotating its flagellum and if the resulting movement is important for some part of the infectious process, this would recall the observation that *Salmonella typhimurium* and *Vibrio anguillarum* mutants of the chemotactic pathway, which are still able to build and rotate their flagella, are more invasive than the WT strain (Jones *et al.*, 1992; Larsen and Boesen, 2001). This leads to the hypothesis that *Brucella*, when becoming more and more restricted to its intrahost niche, did not need the chemotactic pathway any more and discarded it. Whatever the exact function(s) of the *Brucella* flagellum may be, it certainly deserves further investigations to uncover the step(s) of the infection in which it is involved, the signal(s) which turn on its expression and the regulatory network leading to the finely tuned synthesis of such a complex structure which seems to play a crucial role in establishment of a chronic infection.

Experimental procedures

Bacterial strains and plasmids

Brucella melitensis 16M was obtained from A. MacMillan, Central Veterinary Laboratory, Weybridge, UK. We selected a spontaneous nalidixic acid-resistant (Nal^R) mutant of this strain and all *Brucella* strains used in this study were derived from this Nal^R mutant. *E. coli* DH10B (Gibco BRL), S17-1 (Simon *et al.*, 1983) and BL21(DE3) (Novagen) were used for cloning, plasmid mobilization in *B. melitensis* and protein overexpression respectively. *B. melitensis* and *E. coli* strains were grown as described (Tibor *et al.*, 2002). DNA manipulation was performed according to standard techniques (Ausubel, 1989).

Sequence analysis

Genomic sequence of *B. melitensis* 16M was analysed with the database of the URBM bioinformatic group: http://www.serine.urbm.fundp.ac.be/~seqbruce/GENOMES/Brucella_melitensis. Genomic sequences of *S. meliloti* and *M. loti* were analysed with the Rhizobase: <http://www.kazusa.or.jp/rhizobase/>.

β -Galactosidase assay

Construction of plasmid pBBCmp*fliF*-lacZ. The *lacZ* coding region deleted from its 27 first nucleotides was cloned into pBBR1MCS (Elzer *et al.*, 1994). A region containing the *fliF* promoter (including 137 bp of the 3' end of the *fliC* ORF, 203 bp of the *fliC*-*fliF* intergenic region and 65 bp of the predicted 5' end of *fliF*) was amplified from *B. melitensis* 16M Nal^R genomic DNA

with the primers FLIFAM (5'-ATATCTAGACGCTCGTCGATGC CGACA-3') and FLIFAV (5'-ATTGGATCCCCGAGCGTTCCCT TGAGC-3') containing *Xba*I and *Bam*HI restriction sites respectively. The polymerase chain reaction (PCR) product was first subcloned into pGEM-T Easy Vector (PROMEGA) and then inserted in frame upstream the promoterless *lacZ* reporter gene into pBBR1MCS.

β-Galactosidase enzyme assay. The plasmid pBBCmpfliF-lacZ was conjugatively transferred into *B. melitensis* 16M Nal^R strain, and samples were harvested at different times during the growth at 37°C in 2YT broth containing chloramphenicol, and *β*-galactosidase assays were performed on the samples in agreement with the method described by Miller (1972).

Protein purification, generation of antibodies and immunoblot analysis

Brucella melitensis recombinant FliC and FlgE were overexpressed in *E. coli* as fusion proteins with an N-terminal polypeptide comprising a hexahistidine peptide (Novagen). The *fliC* and *flgE* ORFs were amplified by PCR (the primers contained an *Nde*I site added on the 5' end and a *Bam*HI site on the 3' end of these genes) and cloned first into the *Eco*RV site of pSK-oriT vector. The DNA sequences of the PCR-amplified fragments were determined at this stage. The resulting plasmids were then digested with *Nde*I and *Bam*HI and their insert was subcloned into these sites in pET15b. After overexpression in *E. coli* BL21DE3, protein purification was performed on a 2.5 ml nickel chelation resin column (His-Bind; Novagen) in 6 M urea as recommended by the manufacturer. Immunization was performed as described previously (Denoel *et al.*, 1997) with 50 µg of purified recombinant proteins to produce specific antibodies to FliC and FlgE. Immunoblot analysis was performed as described (Bellefontaine *et al.*, 2002). Anti-FliC or anti-FlgE polyclonal antibodies were diluted 1:1000 and the anti-OMP1 mAb A5310B2 was used as a positive control (Cloekaert *et al.*, 1990). These antibodies were revealed using, respectively, donkey anti-rabbit (Amersham) and goat anti-mouse (Amersham) horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies.

Transmission electron microscopy (TEM) and immunogold labelling

Bacteria were grown in rich medium at 37°C to an OD at 600 nm of 0.25. Bacteria were centrifuged at 1000 r.p.m. for 20 min (Jouan), washed in PBS and fixed for 20 min in 50 µl of 4% paraformaldehyde pH 7.3. Bacteria were stored at 4°C. A carbon formvar-coated grid was placed on a drop of a solution of 1% Alcian blue for 5 min, rinsed five times in water and then placed on a drop of bacterial suspension for 10 min. The grid is then placed onto drops of the following buffers: five washes in PBS-5% glycine, PBS-5% bovine serum albumin (PBS-BSA) for 1 min, PBS-BSA containing the anti-*Brucella* LPS O-chain (M epitope) mAb A156b3b2 (Cloekaert *et al.*, 1993) diluted 1:20 (1 h) in PBS-BSA, PBS (five washes), rabbit anti-mouse conjugated to gold particles (15 nm) diluted 1:20 in PBS-BSA (45 min), PBS (three washes), H₂O (two washes). Adherent cells were negatively stained with a 1% aqueous solution of uranyl acetate for 10 s. Samples were examined with a transmission electron microscope (Technai 10, Philips).

B. melitensis flagellum is a virulence factor in mice 695

Immunofluorescence assays

For the construction of the pBBp*flfF*-gfp, the sequence located upstream of the *flfF* CDS was amplified by PCR from genomic DNA of *B. melitensis* 16M Nal^R with the primers up*flfF* (5'-GGTACCCCGGTCTTCGTATTCTG-3') and low*flfF* (5'-agatc tgccatcctgtgaacgaag-3') containing in 5' the *Asp*718 and *Bgl*II restriction sites respectively. The PCR product was cloned into pGEM-T Easy vector. This construct was digested by *Asp*718 and *Bgl*II and the 1 kb insert was cloned into the corresponding sites of the broad host range plasmid pBBR1-GFP. This construct was checked by sequencing of the insert with plasmid templates. The infected cells were fixed at different times after infection for GFP detection and immunofluorescence staining with anti-*Brucella* LPS O-chain mAb 12G12 (Cloekaert *et al.*, 1993) as described previously (Delrue *et al.*, 2001). Secondary antibodies used were Alexia 568-conjugated anti-mouse IgG (Molecular probes).

Construction and characterization of the flagellar mutants

To construct a *B. melitensis* *flgE* mutant by allelic replacement, the *flgE* coding sequence (BMEI10159) was amplified by PCR from genomic DNA of *B. melitensis* 16M Nal^R with the primers up*flgE* (5'-GAAATCCCAAGGGCTACA-3') and low*flgE* (5'-TTCAGGGGCGAAAGATC-3'). The PCR product was cloned into the *Eco*RV site of plasmid pSK-oriT (Tibor *et al.*, 2002). This vector is mobilizable and is unable to replicate in *Brucella*. A 318 bp *Nar*I fragment was excised from the resulting plasmid and replaced by the 1.3 kb *Bam*HI kanamycin resistance cassette (*kan*) from pUC4K (Pharmacia), producing plasmid pDHOOK.

The *flfF1*, *flhA2*, *flhB*, *flgI*, *motB* and *fliC* mutants were constructed by insertional inactivation. In order to allow the transconjugants containing our constructs to be selected in the presence of kanamycin, the *kan* cassette was amplified from the pUC4K with primers *kanamont* (5'-GGGCATGCGGAAAGCCACGTTGT GTCT-3') and *kanaval* (5'-GGGGTGACCTTAGAAAACTCATC GAGCAT-3') and cloned into the *Sal*I site of the *bla* gene of pSK-oriT. This generated the plasmid pSKKan. The internal fragments of the *flfF1*, *flhA2*, *flgI*, *motB* and *fliC* coding sequences were amplified by PCR from genomic DNA of *B. melitensis* 16M Nal^R with the following pairs of primers. The primers low*flfF1* (5'-CCCCATATTGTCGAACAG-3') and up*flfF1* (5'-TCGCCATC-CTACGAGAC-3') amplify from nucleotide (nt) 153 to nt 372 from the *flfF1* ORF (BMEI10151, 729 bp in length). The primers up*flhA* (5'-CGCCGTGAAGTGGAGGAG-3') and low*flhA* (5'-GCGGCG CATCTTGTGAC-3') amplify from nt 226 to nt 855 from the *flhA2* ORF (BMEI10167, 1767 bp in length). Primers up*flgI* (5'-GCGGCGCTGAAGGACATC-3') and low*flgI* (5'-ACGGCG GTCGTGAAATCG-3') allow amplification from nt 113 to nt 635 of the 1290 nt *flgI* ORF. The primers up*motB* (5'-GGCGGGGT GTGGAAGATT-3') and low*motB* (5'-CGGGCGCACAGTGGT GTC-3') allow amplification from nt 79 to nt 329 of the 1137 bp *motB* ORF. The primers up*fliC* (5'-TATCATGGTGCCAACTACGCGG-3') and low*fliC* (5'-ttaaggatcccgGAGCCGTACCAA-3') allow the amplification from nt 378 to nt 583 of the 846 nt *fliC* ORF. These amplicons were cloned into the *Eco*RV site of the pSKKan [*flfF1* amplicon was first cloned into pGEM-T easy vector (Promega)]. These constructs were checked by sequencing of the insert with plasmid templates.

Plasmid mobilization into *B. melitensis*, mutant selection and confirmation of gene inactivation by Southern blot analysis were performed as described by Tibor *et al.* (2002).

696 D. Fretin et al.

Cell culture and bacterial infection

Survival of *Brucella* strains was evaluated in an immortalized cell line of bovine peritoneal macrophages (Stabel and Stabel, 1995) and in epitheloid human HeLa cells by the procedure described by Delrue *et al.* (2001).

In addition to these assays, several other infection procedures were applied only to the *flhF* mutant in comparison to the WT strain. A gentamicin survival assay to quantify *Brucella* invasion in HeLa cells as described previously (Delrue *et al.*, 2001). An infection of ovine macrophagic cell line at a low multiplicity of infection (moi) (0.1 bacteria per cell) and a follow-up during 7 days as described in studies on *Legionella pneumophila* flagellum (Dietrich *et al.*, 2001). Infection of fresh bovine blood monocytes in suspension as described for a *Brucella* infection of human blood monocytes (Rittig *et al.*, 2001).

All the above infections used *Brucella* cells from an overnight culture. An infection of ovine macrophagic cell line according to the classical protocol (Delrue *et al.*, 2001) was designed to compare *Brucella* cells harvested in the phase of the growth curve where flagellar genes are known to be expressed and *Brucella* cells from an overnight culture.

Knowing that flagellar genes are expressed intracellularly, we designed a protocol which used infected cells as inoculum. Briefly, ovine macrophagic cells were infected according to our current protocol (Delrue *et al.*, 2001) and harvested by trypsinization after 48 h. After washing in PBS, infected cells were resuspended at 10^5 ml⁻¹ in complete RPMI medium with gentamicin and layered on a monolayer of fresh non-infected cells of the same origin by centrifugation at 1200 r.p.m. After 1 h incubation at 37°C, wells were washed and incubated in fresh complete RPMI medium.

Virulence assay in the BALB/c mouse model

Eight-week-old female mice were inoculated intraperitoneally with 0.2 ml of a suspension containing around 10^4 cfu of each bacterial strain harvested with PBS from a 24-h 2YT liquid culture (exact doses were retrospectively assessed). At appropriate intervals after inoculation, five mice from each treatment group were sacrificed for spleen collection. Bacterial survival was determined following homogenization of the mouse spleens in 2 ml of distilled water. Serial dilutions of the homogenates were plated on 2YT agar to determine bacterial counts. To determine the significance of differences observed in our experiment, pairwise comparisons were performed by Scheffé tests after ANOVA2 providing the residual mean square estimate with the highest available degree of freedom.

Acknowledgements

Part of this work was supported by the Commission of the European Communities, contract No. QLK2-CT-1999-00014. David Fretin, Sandrine Leonard, Jonathan Ferooz and Caroline Nijskens holds a specialization grant from the Fonds pour la Formation à la Recherche dans l'Industrie et dans l'Agriculture (FRRIA). We acknowledge the 'Service Interfacultaire de Microscopie Electronique' of the University of Namur and for its expertise in TEM. We are grateful to the *Brucella* team of the URBM, Jan Mast of the veterinary and agrochemical research centre for helpful discussions and S. Ouahrani-Bettache for cloning experiments.

References

- Abdallah, A.I., Commander, N.J., Woodward, M.J., Spencer, S., Hart, C.A., and Winstanley, C. (2003) Type III secretion homologs are present in *Brucella melitensis*, *B. ovis*, and *B. suis* biovars 1, 2, and 3. *Curr Microbiol* **46**: 241–245.
- Aldridge, P., and Hughes, K.T. (2002) Regulation of flagellar assembly. *Curr Opin Microbiol* **5**: 160–165.
- Alton, G.G., Jones, L.M., and Pietz, D.E. (1975) Laboratory techniques in brucellosis, 2nd ed. Monograph Series Number 55. Geneva: World Health Organization.
- Anderson, P.E., and Gober, J.W. (2000) FlhT, the post-transcriptional regulator of flagellin synthesis in *Caulobacter crescentus*, interacts with the 5' untranslated region of flagellin mRNA. *Mol Microbiol* **38**: 41–52.
- Armitage, J.P. (2004) *Bacterial Behavior*. New York: Springer-Verlag.
- Ausubel, F.M. (1989) *Current Protocols in Molecular Biology*. New York: John Wiley & Sons.
- Barnett, M.J., Fisher, R.F., Jones, T., Komp, C., Abola, A.P., Barloy-Hubler, F., *et al.* (2001) Nucleotide sequence and predicted functions of the entire *Sinorhizobium meliloti* pSymA megaplasmid. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 9883–9888.
- Bellefontaine, A.F., Pierreux, C.E., Mertens, P., Vandenhaute, J., Letesson, J.J., and De Bolle, X. (2002) Plasticity of a transcriptional regulation network among alpha-proteobacteria is supported by the identification of CtrA targets in *Brucella abortus*. *Mol Microbiol* **43**: 945–960.
- Blocker, A., Komoriya, K., and Aizawa, S. (2003) Type III secretion systems and bacterial flagella: insights into their function from structural similarities. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 3027–3030.
- Boschirol, M.L., Ouahrani-Bettache, S., Foulongne, V., Michaux-Charachon, S., Bourg, G., Allardet-Servent, A., *et al.* (2002) Type IV secretion and *Brucella* virulence. *Vet Microbiol* **90**: 341–348.
- Byrne, B., and Swanson, M.S. (1998) Expression of *Legionella pneumophila* virulence traits in response to growth conditions. *Infect Immun* **66**: 3029–3034.
- Capela, D., Barloy-Hubler, F., Gouzy, J., Bothe, G., Ampe, F., Batut, J., *et al.* (2001) Analysis of the chromosome sequence of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti* strain 1021. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 9877–9882.
- Cloekaert, A., de Wergifosse, P., Dubray, G., and Limet, J.N. (1990) Identification of seven surface-exposed *Brucella* outer membrane proteins by use of monoclonal antibodies: immunogold labeling for electron microscopy and enzyme-linked immunosorbent assay. *Infect Immun* **58**: 3980–3987.
- Cloekaert, A., Zygmunt, M.S., Dubray, G., and Limet, J.N. (1993) Characterization of O-polysaccharide specific monoclonal antibodies derived from mice infected with the rough *Brucella melitensis* strain B115. *J Gen Microbiol* **139**: 1551–1556.
- DelVecchio, V.G., Kapatral, V., Elzer, P., Patra, G., and Mijer, C.V. (2002) The genome of *Brucella melitensis*. *Vet Microbiol* **90**: 587–592.
- Delrue, R.M., Martinez-Lorenzo, M., Lestrade, P., Danese, I., Bielarz, V., Mertens, P., *et al.* (2001) Identification of *Brucella* spp. genes involved in intracellular trafficking. *Cell Microbiol* **3**: 487–497.
- Denoel, P.A., Vo, T.K., Tibor, A., Weynants, V.E., Trunde, J.M., Dubray, G., *et al.* (1997) Characterization, occurrence, and molecular cloning of a 39-kilodalton *Brucella*

- abortus* cytoplasmic protein immunodominant in cattle. *Infect Immun* **65**: 495–502.
- Dietrich, C., Heuner, K., Brand, B.C., Hacker, J., and Steinert, M. (2001) Flagellum of *Legionella pneumophila* positively affects the early phase of infection of eukaryotic host cells. *Infect Immun* **69**: 2116–2122.
- Eggenhofer, E., Haslbeck, M., and Scharf, B. (2004) MotE serves as a new chaperone specific for the periplasmic motility protein, MotC, in *Sinorhizobium meliloti*. *Mol Microbiol* **52**: 701–712.
- Elzer, P.H., Phillips, R.W., Kovach, M.E., Peterson, K.M., and Roap, R.M. (1994) Characterization and genetic complementation of a *Brucella abortus* high-temperature-requirement A (htrA) deletion mutant. *Infect Immun* **62**: 4135–4139.
- Ficht, T.A. (2003) Intracellular survival of *Brucella*: defining the link with persistence. *Vet Microbiol* **92**: 213–223.
- Finan, T.M., Weidner, S., Wong, K., Buhrmester, J., Chain, P., Vorholter, F.J., et al. (2001) The complete sequence of the 1,683-kb pSymB megaplasmid from the N₂-fixing endosymbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 9889–9894.
- Forestier, C., Deleuil, F., Lapaque, N., Moreno, E., and Gorvel, J.P. (2000) *Brucella abortus* lipopolysaccharide in murine peritoneal macrophages acts as a down-regulator of T cell activation. *J Immunol* **165**: 5202–5210.
- Foulongne, V., Bourg, G., Cazeville, C., Michaux-Charachon, S., and O'Callaghan, D. (2000) Identification of *Brucella suis* genes affecting intracellular survival in an *in vitro* human macrophage infection model by signature-tagged transposon mutagenesis. *Infect Immun* **68**: 1297–1303.
- Fuerst, J.A., and Perry, J.W. (1988) Demonstration of lipopolysaccharide on sheathed flagella of *Vibrio cholerae* O:1 by protein A-gold immunoelectron microscopy. *J Bacteriol* **170**: 1488–1494.
- Galibert, F., Finan, T.M., Long, S.R., Puhler, A., Abola, P., Ampe, F., et al. (2001) The composite genome of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Science* **293**: 668–672.
- Ghelardi, E., Celandroni, F., Salvetti, S., Beecher, D.J., Gominet, M., Lereclus, D., et al. (2002) Requirement of flhA for swarming differentiation, flagellin export, and secretion of virulence-associated proteins in *Bacillus thuringiensis*. *J Bacteriol* **184**: 6424–6433.
- Godfroid, F., Taminiau, B., Danese, I., Denoel, P., Tibor, A., Weynants, V., et al. (1998) Identification of the perosamine synthetase gene of *Brucella melitensis* 16M and involvement of lipopolysaccharide O side chain in *Brucella* survival in mice and in macrophages. *Infect Immun* **66**: 5485–5493.
- Guzman-Verri, C., Manterola, L., Sola-Landa, A., Parra, A., Cloeckaert, A., Garin, J., et al. (2002) The two-component system BvrR/BvrS essential for *Brucella abortus* virulence regulates the expression of outer membrane proteins with counterparts in members of the Rhizobiaceae. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 12375–12380.
- Hallez, R., Bellefontaine, B., Letesson, J.J., and De Bolle, X. (2004) Morphological and functional asymmetry in α -proteobacteria. *Trends Microbiol* **12**: 361–365.
- Halling, S.M. (1998) On the presence and organization of open reading frames of the nonmotile pathogen *Brucella abortus* similar to class II, III, and IV flagellar genes and to LcrD virulence superfamily. *Microb Comp Genomics* **3**: 21–29.
- B. *melitensis* flagellum is a virulence factor in mice 697
- Hauwaerts, D., Alexandre, G., Das, S.K., Vanderleyden, J., and Zhulin, I.B. (2002) A major chemotaxis gene cluster in *Azospirillum brasilense* and relationships between chemotaxis operons in alpha-proteobacteria. *FEMS Microbiol Lett* **208**: 61–67.
- Hernandez, F., and Monge-Najera, J. (1994) Ultrastructure of the bacteria *Campylobacter* and *Helicobacter*: implications for the phylogeny of mammal gastric bacteria. *Rev Biol Trop* **42**(Suppl. 2): 85–92.
- Jacobs, M., Brown, N., Allie, N., Gulert, R., and Ryffel, B. (2000) Increased resistance to mycobacterial infection in the absence of interleukin-10. *Immunology* **100**: 494–501.
- Jenal, U., and Shapiro, L. (1996) Cell cycle-controlled proteolysis of a flagellar motor protein that is asymmetrically distributed in the *Caulobacter* predivisional cell. *EMBO J* **15**: 2393–2406.
- Jones, B.D., Lee, C.A., and Falkow, S. (1992) Invasion by *Salmonella typhimurium* is affected by the direction of flagellar rotation. *Infect Immun* **60**: 2475–2480.
- Josenshans, C., and Suerbaum, S. (2002) The role of motility as a virulence factor in bacteria. *Int J Med Microbiol* **291**: 605–614.
- Jubier-Maurin, V., Boigegrain, R.A., Cloeckaert, A., Gross, A., Alvarez-Martinez, M.T., Terraza, A., et al. (2001) Major outer membrane protein Omp25 of *Brucella suis* is involved in inhibition of tumor necrosis factor alpha production during infection of human macrophages. *Infect Immun* **69**: 4823–4830.
- Kaneko, T., Nakamura, Y., Sato, S., Asamizu, E., Kato, T., Sasamoto, S., et al. (2000a) Complete genome structure of the nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Mesorhizobium loti*. *DNA Res* **7**: 331–338.
- Kaneko, T., Nakamura, Y., Sato, S., Asamizu, E., Kato, T., Sasamoto, S., et al. (2000b) Complete genome structure of the nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Mesorhizobium loti* (supplement). *DNA Res* **7**: 381–406.
- Karlin, S., Barnett, M.J., Campbell, A.M., Fisher, R.F., and Mrazek, J. (2003) Predicting gene expression levels from codon biases in alpha-proteobacterial genomes. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 7313–7318.
- Kim, S., Watarai, M., Kondo, Y., Erdenebaatar, J., Makino, S., and Shirahata, T. (2003) Isolation and characterization of mini-Tn5Km2 insertion mutants of *Brucella abortus* deficient in internalization and intracellular growth in HeLa cells. *Infect Immun* **71**: 3020–3027.
- Kohler, S., Ouahrani-Bettache, S., Layssac, M., Teyssier, J., and Liautard, J.P. (1999) Constitutive and inducible expression of green fluorescent protein in *Brucella suis*. *Infect Immun* **67**: 6695–6697.
- Kohler, S., Foulongne, V., Ouahrani-Bettache, S., Bourg, G., Teyssier, J., Ramuz, M., and Liautard, J.P. (2002) The analysis of the intramacrophagic virulome of *Brucella suis* deciphers the environment encountered by the pathogen inside the macrophage host cell. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 15711–15716.
- Larsen, M.H., and Boesen, H.T. (2001) Role of flagellum and chemotactic motility of *Vibrio anguillarum* for phagocytosis by and intracellular survival in fish macrophages. *FEMS Microbiol Lett* **203**: 149–152.
- Lestrade, P., Delrue, R.M., Danese, I., Didembourg, C., Taminiau, B., Mertens, P., et al. (2000) Identification and characterization of *in vivo* attenuated mutants of *Brucella melitensis*. *Mol Microbiol* **38**: 543–551.
- Lestrade, P., Dricot, A., Delrue, R.M., Lambert, C., Martinelli,

698 D. Fretin et al.

- V., De Bolle, X., et al. (2003) Attenuated signature-tagged mutagenesis mutants of *Brucella melitensis* identified during the acute phase of infection in mice. *Infect Immun* 71: 7053–7060.
- Lorenz, M.C., and Fink, G.R. (2002) Life and death in a macrophage: role of the glyoxylate cycle in virulence. *Eukaryot Cell* 1: 657–662.
- Macnab, R.M. (2003) How bacteria assemble flagella. *Annu Rev Microbiol* 57: 77–100.
- Meador, V.P., Tabatabai, L.B., Hagemoser, W.A., and Deyoe, B.L. (1986) Identification of *Brucella abortus* in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues of cows, goats, and mice with an avidin–biotin–peroxidase complex immunoenzymatic staining technique. *Am J Vet Res* 47: 2147–2150.
- Miller, J.H. (1972) *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Moreno, E., and Moriyon, I. (2002) *Brucella melitensis*: a nasty bug with hidden credentials for virulence. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 1–3.
- Paulsen, I.T., Seshadri, R., Nelson, K.E., Eisen, J.A., Heidelberg, J.F., Read, T.D., et al. (2002) The *Brucella suis* genome reveals fundamental similarities between animal and plant pathogens and symbionts. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 13148–13153.
- Platzer, J., Sterr, W., Hausmann, M., and Schmitt, R. (1997) Three genes of a motility operon and their role in flagellar rotary speed variation in *Rhizobium meliloti*. *J Bacteriol* 179: 6391–6399.
- Ramos, H.C., Rumbo, M., and Sirard, J.C. (2004) Bacterial flagellins: mediators of pathogenicity and host immune responses in mucosa. *Trends Microbiol* 12: 509–517.
- Rittig, M.G., Alvarez-Martinez, M.T., Porte, F., Liautard, J.P., and Rouot, B. (2001) Intracellular survival of *Brucella* spp. in human monocytes involves conventional uptake but special phagosomes. *Infect Immun* 69: 3995–4006.
- Salgado, H., Moreno-Hagelsieb, G., Smith, T.F., and Colado-Vides, J. (2000) Operons in *Escherichia coli*: genomic analyses and predictions. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 6652–6657.
- Scharf, B., and Schmitt, R. (2002) Sensory transduction to the flagellar motor of *Sinorhizobium meliloti*. *J Mol Microbiol Biotechnol* 4: 183–186.
- Scharf, B., Schuster-Wolf-Buhring, H., Rachel, R., and Schmitt, R. (2001) Mutational analysis of the *Rhizobium lupini* H13-3 and *Sinorhizobium meliloti* flagellin genes: importance of flagellin A for flagellar filament structure and transcriptional regulation. *J Bacteriol* 183: 5334–5342.
- Scott, C.C., Botelho, R.J., and Grinstein, S. (2003) Phagosome maturation: a few bugs in the system. *J Membr Biol* 193: 137–152.
- Simon, R., Priefer, U., and Pühler, A. (1983) A broad host range mobilisation system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria. *Bio-technology* 10: 783–791.
- Song, Y.C., Jin, S., Louie, H., Ng, D., Lau, R., Zhang, Y., et al. (2004) FlaC, a protein of *Campylobacter jejuni* TGH9011 (ATCC43431) secreted through the flagellar apparatus, binds epithelial cells and influences cell invasion. *Mol Microbiol* 53: 541–553.
- Sourjik, V., Sterr, W., Platzer, J., Bos, I., Haslbeck, M., and Schmitt, R. (1998) Mapping of 41 chemotaxis, flagellar and motility genes to a single region of the *Sinorhizobium meliloti* chromosome. *Gene* 223: 283–290.
- Soutourina, O.A., and Bertin, P.N. (2003) Regulation cascade of flagellar expression in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 27: 505–523.
- Stabel, J.R., and Stabel, T.J. (1995) immortalization and characterization of bovine peritoneal macrophages transfected with SV40 plasmid DNA. *Vet Immunol Immunopathol* 45: 211–220.
- Szurmant, H., and Ordal, G.W. (2004) Diversity in chemotaxis mechanisms among the Bacteria and Archaea. *Microbiol Mol Biol Rev* 68: 301–319.
- Thomashow, M.F., and Cotter, T.W. (1992) *Bdellovibrio* host dependence: the search for signal molecules and genes that regulate the intraperiplasmic growth cycle. *J Bacteriol* 174: 5767–5771.
- Thomashow, L.S., and Rittenberg, S.C. (1985) Isolation and composition of sheathed flagella from *Bdellovibrio bacteriovorus* 109J. *J Bacteriol* 163: 1047–1054.
- Tibor, A., Wansard, V., Bielartz, V., Delrue, R.M., Danese, I., Michel, P., et al. (2002) Effect of omp10 or omp19 deletion on *Brucella abortus* outer membrane properties and virulence in mice. *Infect Immun* 70: 5540–5546.
- Tominaga, A., Mahmoud, M.A., Mukaihara, T., and Enomoto, M. (1994) Molecular characterization of intact, but cryptic, flagellin genes in the genus *Shigella*. *Mol Microbiol* 12: 277–285.
- Umelo, E., and Trust, T.J. (1997) Identification and molecular characterization of two tandemly located flagellin genes from *Aeromonas salmonicida* A449. *J Bacteriol* 179: 5292–5299.
- Weber, I., Fritz, C., Ruttkowski, S., Kreft, A., and Bange, F.C. (2000) Anaerobic nitrate reductase (narGHJI) activity of *Mycobacterium bovis* BCG *in vitro* and its contribution to virulence in immunodeficient mice. *Mol Microbiol* 35: 1017–1025.
- Yanagi, M., and Yamasato, K. (1993) Phylogenetic analysis of the family Rhizobiaceae and related bacteria by sequencing of 16S rRNA gene using PCR and DNA sequencer. *FEMS Microbiol Lett* 107: 115–120.
- Young, G.M., Schmiel, D.H., and Miller, V.L. (1999) A new pathway for the secretion of virulence factors by bacteria: the flagellar export apparatus functions as a protein-secretion system. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 6456–6461.

ANNEXE VI : Léonard *et al.* 2007

JOURNAL OF BACTERIOLOGY, Jan. 2007, p. 131–141
 0021-9193/07/\$08.00+0 doi:10.1128/JB.00712-06
 Copyright © 2007, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Vol. 189, No. 1

FtcR Is a New Master Regulator of the Flagellar System of *Brucella melitensis* 16M with Homologs in *Rhizobiaceae*[†]

S. Léonard,¹ J. Ferooz,¹ V. Haine,¹ I. Danese,² D. Fretin,² A. Tibor,¹ S. de Walque,³
 X. De Bolle,¹ and J.-J. Letesson^{1*}

Unité de Recherche en Biologie Moléculaire, Laboratoire d'Immunologie-Microbiologie, Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix, Namur, Belgium¹; Centre d'Etude et de Recherches Vétérinaires et Agronomiques, Brussels, Belgium²; and Service de Chimie Biologique, Institut de Biologie et de Médecine Moléculaires, Université Libre de Bruxelles, Gosselies, Belgium³

Received 18 May 2006/Accepted 5 October 2006

The flagellar regulon of *Brucella melitensis* 16M contains 31 genes clustered in three loci on the small chromosome. These genes encode a polar sheathed flagellum that is transiently expressed during vegetative growth and required for persistent infection in a mouse model. By following the expression of three flagellar genes (*fliF*, *flgE*, and *fliC*, corresponding to the MS ring, hook, and filament monomer, respectively), we identified a new regulator gene, *ftcR* (flagellar two-component regulator). Inactivation of *ftcR* led to a decrease in flagellar gene expression and to impaired *Brucella* virulence. FtcR has a two-component response regulator domain as well as a DNA binding domain and is encoded in the first flagellar locus of *B. melitensis*. Both the *ftcR* sequence and its genomic context are conserved in other related α -proteobacteria. During vegetative growth in rich medium, *ftcR* expression showed a peak during the early exponential phase that paralleled *fliF* gene expression. VjbR, a quorum-sensing regulator of the LuxR family, was previously found to control *fliF* and *flgE* gene expression. Here, we provide some new elements suggesting that the effect of VjbR on these flagellar genes is mediated by FtcR. We found that *ftcR* expression is partially under the control of VjbR and that the expression in *trans* of *ftcR* in a *vjbR* mutant restored the production of the hook protein (FlgE). Finally, FtcR binds directly to the upstream region of the *fliF* gene. Therefore, our data support the role of FtcR as a flagellar master regulator in *B. melitensis* and perhaps in other related α -proteobacteria.

Flagella are highly complex bacterial organelles that are usually well conserved among diverse bacterial species (17, 39, 46). In addition to motility, the bacterial flagellum is involved in a variety of interactions between the bacterium and its environment (e.g., adhesion, biofilm formation, secretion, and modulation of the host response) (7, 16, 20, 22, 30, 36, 42, 50, 53, 57). Flagellar expression involves about 50 flagellar genes, distributed into three or four classes as observed in *Escherichia coli* (1) and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (31) or in *Caulobacter crescentus* (38), *Pseudomonas aeruginosa* (10), and *Vibrio cholerae* (41). Complex regulation processes control this hierarchical system, allowing for the expression of the genes of one downstream class if the genes from the upstream class have been expressed.

At the top of the flagellar regulatory cascade, one or more distinct master genes encode the transcriptional regulators responsible for turning on and off flagellar synthesis, in response to environmental factors and cell cycle-related signals. In γ -proteobacteria, this so-called class I is represented by a heterotetrameric complex, FlhD₂C₂ (lateral flagellar systems), or a sigma 54-associated transcriptional activator of the NtrC family (polar flagellar systems) (4, 52). The situation is somewhat different in α -proteobacteria. In *C. crescentus*, a two-component response regulator called CtrA controls a part of

the asymmetric cell cycle as well as the initiation of the flagellar cascade (49), whereas in *Sinorhizobium meliloti*, two LuxR type regulators, VisR and VisN, are at the top of the flagellar hierarchy (51). Direct binding of VisR or VisN to a promoter of a class II gene (e.g., *fliF*) has never been demonstrated, and so, the involvement of other unidentified effectors acting in concert with VisN/VisR at the top of the hierarchy cannot be excluded (51).

Recent studies have shown that *Brucella melitensis* possesses 31 flagellar genes and builds, under strictly defined conditions, a polar sheathed flagellum required for virulence in a mouse infection model (14). The flagellar hierarchy has not been characterized in *Brucella*. A comparison of the three *Brucella* flagellar clusters with the unique cluster of structural flagellar genes from *S. meliloti* (15) revealed extensive gene synteny, namely, a high conservation in the order of genes. Like the *visNR* operon of *S. meliloti*, two regulator genes are located downstream and in the reverse orientation from a set of flagellar genes in *Brucella*. Nevertheless, only one of these two, called VjbR (11), belongs to the LuxR family. The second regulator is of the TetR family, and its function is presently unknown (11). VjbR was recently described as a quorum-sensing regulator that activates the expression of the *virB* secretion system and the flagellar apparatus of *B. melitensis*, both required for virulence in BALB/c mice. A $\Delta vjbR$ strain does not express *fliF* (coding for the MS ring monomer) and does not produce the FlgE protein (hook monomer). Moreover, an excess of the quorum-sensing pheromone *N*-dodecanoyl homoserine lactone represses FlgE production, probably by inhibiting VjbR activity (11). VjbR could constitute a second example

* Corresponding author. Mailing address: Laboratoire d'Immunologie-Microbiologie, Unité de Recherche en Biologie Moléculaire (URBM), Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix, rue de Bruxelles 61, 5000 Namur, Belgium. Phone: (32) 81 72 44 02. Fax: (32) 81 72 44 20. E-mail: jean-jacques.letesson@fundp.ac.be.

[†] Published ahead of print on 20 October 2006.

TABLE 1. Strains and plasmids used in this study

Strain or plasmid	Description	Reference or source
<i>B. melitensis</i> strains		
16M Nal ^r	Spontaneous nalidixic acid-resistant strain of <i>B. melitensis</i> 16M obtained from A. P. MacMillan, Central Veterinary Laboratory, Weybridge, United Kingdom	Laboratory collection
<i>ftcR</i> mutant	16M Nal ^r <i>ftcR</i> integrative mutant	This study
<i>vjbR</i> mutant	16M Nal ^r Δ- <i>vjbR</i>	11
<i>E. coli</i> strains		
BL21(DE3)pLysS	F ⁻ <i>ompT gal dcm hsdS_B(r_B⁻m_B⁻)</i> (DE3) [pLysS, Cm ^r]	Novagen
DH10B	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr hsdRMS mcrBC</i>) φ80 <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i> Δ <i>lacX74</i> <i>recA1 endA1 araΔ139</i> Δ(<i>ara leu</i>)7697 <i>galU galK</i> λ ⁻ <i>rpsL</i> (Str ^r) <i>nupG</i>	Gibco BRL
S17-1	<i>thi pro hsdR hsdM⁺ recA</i> RP4-2 (Tc::Mu-Km::Tn7)	48
<i>C. crescentus</i> strain		
NA1000	<i>syn</i> -1000, synchronizable variant of strain CB15	13
Plasmids		
pBBCm- <i>lacZ</i>	Promoterless <i>lacZ</i> vector, Cm ^r	14
pBBCmp <i>fliF-lacZ</i>	<i>fliF-lacZ</i> transcriptional reporter, Cm ^r	14
pBBCmp <i>ftcR-lacZ</i>	<i>ftcR-lacZ</i> transcriptional reporter, Cm ^r	This study
pBBNrs <i>fliF-lacZ</i>	<i>fliF-lacZ</i> transcriptional reporter, Nrs ^r	This study
pBBp <i>fliF-gfp</i>	<i>fliF-gfp</i> transcriptional reporter, Amp ^r Cm ^r	14
pBBR1MCS-4	Medium-copy broad-host-range cloning vector, Amp ^r	27
pBBR- <i>vjbR</i>	<i>vjbR</i> in pBBR1MCS-4	11
pDONR201	Gateway donor vector	Invitrogen
pDONR <i>ftcR</i>	<i>ftcR</i> Gateway entry vector	This study
pDONRp <i>ftcR-ftcR</i>	<i>pftcR-ftcR</i> Gateway entry vector	This study
pET15b-GW	T7 expression vector pET15b from Novagen containing <i>attR</i> recombination Gateway sequences	B. Vandriessche, unpublished data
pET15b <i>ftcR</i>	<i>ftcR</i> in pET15b-GW	This study
pFA6a-natMX6	Nourseothricin acetyltransferase donor plasmid	Werner BioAgents
pGEM-T Easy	Cloning vector	Promega
pGEMT <i>pftcR</i>	<i>pftcR</i> in pGEM-T Easy vector	This study
pMR10CmKm	Low-copy-no. broad-host-range vector, Cm ^r , Km ^r	43
pMR10-GW	Low-copy-no. broad-host-range vector pMR10 containing <i>attR</i> recombination Gateway sequences	R. Hallez, unpublished data
pMRp <i>ftcR-ftcR</i>	<i>pftcR-ftcR</i> in pMR10-GW	This study
pMR <i>plac-ftcR</i>	<i>ftcR</i> in pMR10-GW	This study
pSKKan	Suicide plasmid, Km ^r	14
pSK <i>ftcR</i>	<i>ftcR</i> disruption suicide plasmid	This study

of the LuxR-type master flagellar regulator as in *S. meliloti*, but its effect is known for only two flagellar components (FliF and FlgE). The direct or indirect nature of this control has not yet been determined (11).

Besides the TetR-type and the VjbR regulators, there is a third gene coding for a predicted transcriptional regulator within the *Brucella* flagellar loci, with synteny in *S. meliloti*. This gene was called *ftcR* for “flagellar two-component regulator” (14). The FtcR regulator is in fact predicted to belong to the two-component response regulator family. Because the function of *Brucella melitensis* FtcR and its homologs in other α-proteobacteria is unknown, we set out to elucidate its role in flagellar regulation. In this paper, we demonstrate that FtcR is required in *B. melitensis* 16M for the transcription of the *fliF* gene during vegetative and intracellular growth and for the production of the two structural flagellar components FlgE and FliC during vegetative growth. We also show that an *ftcR* mutant has the same virulence phenotype as previously found with structural flagellar mutants. Furthermore, we show that FtcR directly and specifically binds to the *fliF* upstream region.

Finally, we establish that the expression of *ftcR* in *trans* on a plasmid can complement a Δ*vjbR* strain for FlgE production and that *ftcR* is partially activated by VjbR. These data suggest that FtcR could mediate the action of VjbR on flagellar gene expression.

Taken together, these data indicate that FtcR could constitute a master regulator of the *Brucella* flagellar regulon and raises the possibility that FtcR homologs in other α-proteobacteria may play the same role.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains and culture conditions. All strains and plasmids used in this study are listed in Table 1 and oligonucleotides in Table 2. *B. melitensis* 16M strains were grown with shaking at 37°C in 2YT medium (1% yeast extract, 1.6% peptone, 0.5% NaCl) from an initial optical density at 600 nm (OD₆₀₀) of 0.05. *C. crescentus* strains were grown at 30°C in PYE medium (40). *E. coli* strains were grown at 37°C in Luria-Bertani (LB) broth (44). Antibiotics were used at the following final concentrations: ampicillin, 100 μg/ml; chloramphenicol, 20 μg/ml; kanamycin, 30 μg/ml; nalidixic acid, 25 μg/ml; and nourseothricin, 50 μg/ml. DNA was transferred into *B. melitensis* or into *C. crescentus* using the *E. coli* S17-1 strain harboring the mobilization plasmid RP4. The *E. coli* strain DH10B

TABLE 2. Oligonucleotides used in this study

Oligonucleotide	Sequence (5' to 3')	Source
F2C2	ATCTCTAGAGACGACAGAGACATGGTGA	This study
R2C2	ATCGTCGACCTACGCGAGAATTCGCGGACATG	This study
p2c2Xamont	ATATCTAGATTACGCCGCGCGGGCT	This study
p2c2Baval	ATTGGATCCCCTTCGCGACCGAACCA	This study
1038-attB1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAATGATTGTTGTCGTT	This study
1038-attB2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGCTCGATATTGATGCA	This study
attB2-pbifR	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGTTTCAGCCGCGCGGGCTT	This study
attB1-bifR	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAGCTCAGGCTGGGGGACT	This study

was used for the propagation of the plasmids used in this study. BL21(DE3)pLysS was the host strain for the T7 expression system.

Construction of the *ficR* mutant. The *ficR* mutant was constructed by integrative disruption. An internal 0.315-kb fragment from nucleotide 16 to nucleotide 340 of the *ficR* predicted coding sequence (pCDS) was amplified by PCR from genomic DNA of the *B. melioides* 16M Nal^r strain with the F2C2 and R2C2 primers and cloned into the EcoRV site of pSKKan (14) to generate pSKKan*ficR*. The pSKKan*ficR* plasmid was inserted into the *ficR* pCDS of the *B. melioides* 16M Nal^r strain by homologous recombination. Transconjugants were selected by selecting for kanamycin resistance. Southern blot analysis was carried out on genomic DNA by using a probe that hybridized to the kanamycin resistance gene to confirm that one plasmid copy had stably integrated into the target gene, as described by Haime et al. (19).

Plasmid construction. Recombinant DNA techniques were carried out using standard protocols (44).

For construction of the reporter *pficR-lacZ* fusion pBBCmp*ficR-lacZ*, a 0.437-kb fragment containing the *ficR* promoter (*pficR*) (including 24 bp of the 3' end of the upstream hypothetical pCDS, 327 bp of the noncoding region, and 68 bp of the predicted 5' end of *ficR*) was PCR amplified from genomic DNA of the *B. melioides* 16M Nal^r strain with primers p2c2Xamont and p2c2Baval containing XbaI and BamHI sites, respectively. The PCR product was first subcloned into pGEM-T Easy vector (Promega) to generate pGEMT*pficR* and then inserted into pBBCn-*lacZ* (14) in frame upstream of the promoterless *lacZ* reporter gene, generating pBBCmp*ficR-lacZ*.

The nourseothricin-resistant reporter fusion pBBNrs*pflif-lacZ* was obtained by cloning a 1.028-kb region containing the nourseothricin acetyltransferase gene (recovered from the pFA6a-natMX6 vector [Werner BioAgents]) by FspI digestion into the DraI site of the *cat* gene of pBBCmp*pflif-lacZ* (14).

The *FicR* expression vectors pET15*ficR*, pMR*ficR*, and pMR*pficR* were constructed using Gateway Technology (Invitrogen). Briefly, *ficR* pCDS was amplified by PCR from *B. melioides* 16M genomic DNA and tailed with *attB1* and *attB2* sequences using the 1038-attB1 and 1038-attB2 primers. The product was cloned by BP reaction (recombination reaction using BP clonase enzyme mix) into the pDONR201 vector (Invitrogen), generating the pDONR*ficR* entry vector. In the same way, a 1.132-kb fragment containing the *ficR* pCDS and its upstream *pficR* promoter region (*pficR-ficR*) was amplified by PCR from *B. melioides* 16M genomic DNA and tailed with *attB1* and *attB2* sequences using the attB2-pbifR and attB1-bifR primers and then cloned by BP reaction into the pDONR201 plasmid, generating pDONR*pficR-ficR*. All pDONR constructs were verified by sequencing the insert. The *ficR* pCDS was transferred by LR reaction (recombination reaction using LR clonase enzyme mix) from pDONR*ficR* into pMR10-GW under the control of the *plac* promoter, generating the pMR*ficR* plasmid, and into pET15b-GW under the control of the T7 promoter and in frame with an N-terminal histidine tag (His₆) coding sequence, generating the pET15b*ficR* plasmid. The *pficR-ficR* insert was transferred from pDONR*pficR-ficR* into pMR10-GW in an orientation opposite of that for the *plac* promoter, generating pMR*pficR-ficR*.

β-Galactosidase assays. β-Galactosidase assays were performed in line with the protocol of Miller (34) as described by Fretin et al. (14).

SDS-PAGE and immunoblotting. Sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and immunoblotting were performed as previously described (11, 14). Briefly, *B. melioides* cultures were grown for various times until they reached the appropriate phase of growth (an OD₆₀₀ of 0.1 for the end of latent phase and an OD₆₀₀ of 0.25 for the beginning of exponential phase). Total bacterial cell samples were pelleted and resuspended in SDS sample buffer. The proteins were resolved on a 12% polyacrylamide gel and transferred to Hybond ECL nitrocellulose membranes (Amersham). Immunodetection of proteins was performed using anti-FliC or anti-FlgE polyclonal antibody (14) and an

anti-Omp1 monoclonal antibody, A5310B2 (5), as a loading control. The detection of antibodies was performed using donkey anti-rabbit (Amersham) and goat anti-mouse (Dako) horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies as appropriate, and proteins were visualized using the ECL system (Amersham).

Virulence assays. Evaluation of the intracellular survival of the *B. melioides* 16M wild-type strain and the *ficR* mutant in cellular models (HeLa cells and bovine macrophages) was performed as previously described by Delrue et al. (12). Briefly, the strains were grown at 37°C in 2YT medium and then inoculated at a multiplicity of infection of 300 to subconfluent monolayers of HeLa cells or bovine macrophages in 96-well tissue culture plates. After a 10-min centrifugation at 1,000 rpm at room temperature in a Jouan centrifuge, the preparations were placed in a 5% CO₂ atmosphere at 37°C for 1 h. The wells were then washed, and 50 µg/ml gentamicin was added to the cells until the end of the infection time (48 h). Cell monolayers were washed and lysed with 0.1% Triton X-100 in phosphate-buffered saline (PBS) for 20 min, and the lysates were serially diluted and plated onto 2YT plates to count viable bacteria.

Virulence assays with the BALB/c mouse model were performed as described by Fretin et al. (14). Briefly, 8-week-old female mice were inoculated intraperitoneally with a PBS suspension containing approximately 10⁴ CFU of the appropriate bacterial strain. At different intervals after inoculation (1, 4, 8, and 12 weeks), four mice from each treatment group were sacrificed for spleen collection. Each spleen was homogenized in 2 ml of distilled water, and serial dilutions of it were plated on 2YT agar to determine bacterial survival. Data were expressed as the logarithm (log) of the number of CFU per spleen.

Immunofluorescence assays. Bovine macrophages infected with the *B. melioides* 16M wild-type strain and the *ficR* mutant harboring the pBB*pflif-gfp* plasmid (14) were fixed at various times after infection. Bacteria were detected using primary anti-*Brucella* lipopolysaccharide O-chain monoclonal antibody 12G12 (6) and secondary Alexa 568-conjugated anti-mouse immunoglobulin G antibodies (Molecular Probes) as previously described (14).

Expression and purification of recombinant FicR. FicR was overproduced under 1 mM isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside induction in *E. coli* BL21(DE3)pLysS (Novagen) from the pET15b*ficR* plasmid as a fusion protein containing an N-terminal six-histidine tag. Protein purification was performed on a 2.5-ml nickel chelation resin column (His-Bind; Novagen) with elution by 6 M urea as recommended by the manufacturer, followed by renaturation of the protein by dialysis using 1× PBS and 0.03 M Tris, pH 7.9. The protein was concentrated to 0.3 mg/ml using a 15-ml Amicon Ultra centrifugal filter unit (Millipore) and finally stored at -20°C in 50% glycerol.

Electrophoretic mobility shift assay (EMSA). Four 40-bp DNA fragments (synthesized and PAGE purified by Sigma-Genosys) corresponding to the upstream region of *pflif* pCDS (probes 1, 2, 3, and 4) (see Fig. 4) were 5' end radiolabeled using T4 polynucleotide kinase (Biolabs) and [γ-³²P]ATP (Amersham). The promoter probes were purified with Sephadex G50 micro columns (ProbeQuant G-50 micro columns; Amersham) and then by QIAEX II gel extraction (QIAGEN) after separation on a 12% polyacrylamide gel. The protein-DNA binding reactions were carried out as follows. Various amounts of recombinant FicR (from 0 to 200 ng) were first incubated for 10 min at room temperature in the absence of a probe in a 17-µl reaction mixture containing 1 µl dithiothreitol (20 mM), 1 µl bovine serum albumin (10 mg/ml), and 4 µl 5× binding buffer (100 mM Tris-HCl, pH 7.5, 5 mM MgCl₂, 0.5 mM EDTA, 50% glycerol). A total of ~30,000 cpm of probe was then added to the mixture to a final volume of 20 µl with or without a molar excess of an unlabeled competitor probe, and the mixture was incubated for 20 min at room temperature. Samples were then separated on a 6% nondenaturing polyacrylamide gel in 1× TGE buffer (25 mM Tris-acetate, pH 8.3, 190 mM glycine, 1 mM EDTA). To determine the specificity of the binding of recombinant FicR to the *pflif* probes, unlabeled probe 1 (data not shown) or 2 or heterologous DNA containing a

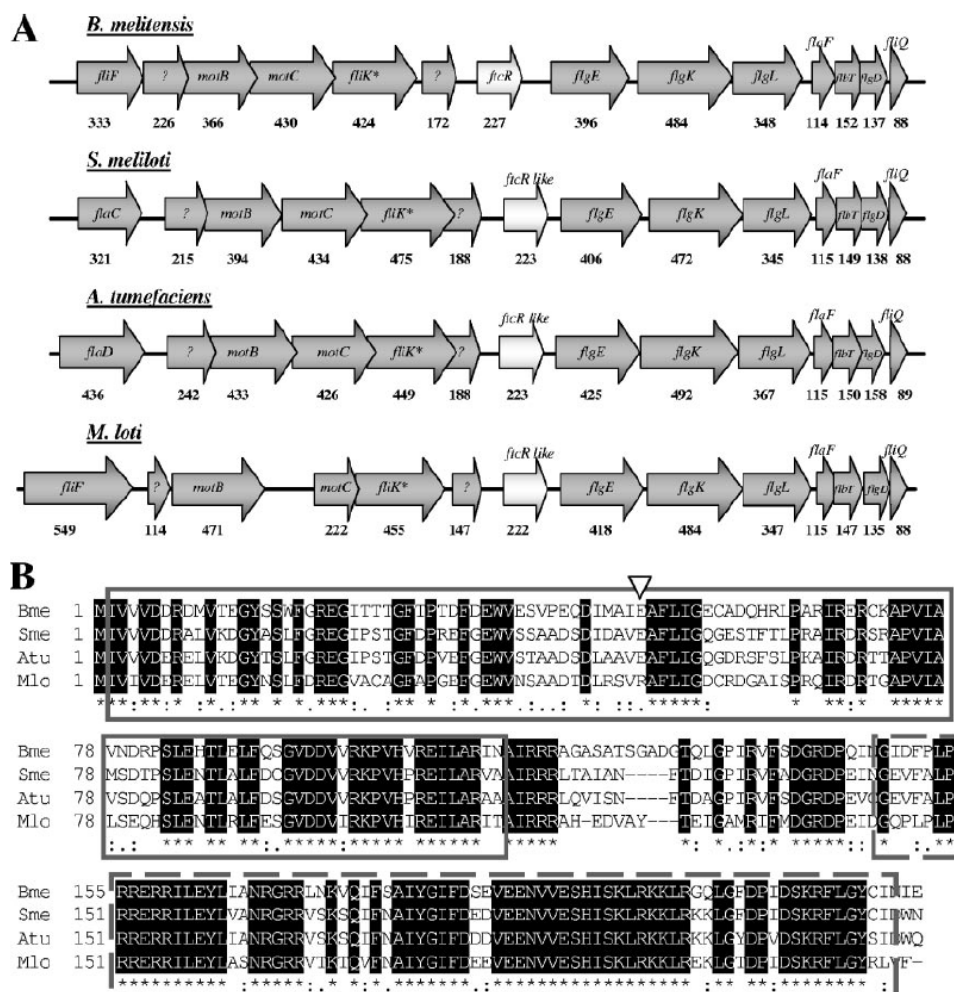


FIG. 1. Analysis of the *FtcR* sequence. (A) Synteny between *B. melitensis* 16M, *A. tumefaciens*, *M. loti*, and *S. meliloti* 1021 in the genomic region containing the *flcR* CDS. The *flcR* CDS is indicated by a white arrow, as is the homologous CDS encoding a predicted response regulator from a two-component system (*flcR* like). The names of the CDSs are written in the arrows. The length in amino acid residues of each CDS is indicated under the arrows. The CDS regions conserved without predicted function (hypothetical conserved) are labeled with a question mark. This genomic region is conserved in *Brucella suis* and *Brucella abortus*. *flkK**, *flkK* was previously called *motD*. (B) CLUSTALW multiple alignment of the deduced amino acid sequences of the pCDSs located upstream of the *flgE* gene in *B. melitensis* (Bme; AAL53399.1), *S. meliloti* (Sme; AAG48153.1), *A. tumefaciens* (Atu; NP_353599.1), and *M. loti* (Mlo; NP_104158.1) (GenBank accession numbers are in parentheses). Residues marked with an asterisk and shaded black correspond to identical residues. Residues marked with points belong to a conserved group of amino acids defined as weak (one point) or strong (two points) by CLUSTALW 1.83. The frames indicate the response regulator domain (continuous line) and the transcriptional regulatory domain (discontinuous line) as recognized in Pfam. The white inverted triangle indicates the classical position of the conserved aspartate in the phosphorylation site replaced by another residue in *B. melitensis*, *S. meliloti*, *A. tumefaciens* (E), and *M. loti* (R).

mammalian Oct binding site (CV1048, 5'-TGTCGAATGCAAATCACTAGA A-3') was included in the competition assay.

Statistical analysis. Data were analyzed by one-way analysis of variance after testing of the homogeneity of variance. Post hoc comparisons were performed by a pair-wise Scheffé test.

RESULTS

The *flcR* gene encodes a predicted two-component response regulator conserved in *Rhizobiaceae*. BMEI10158 on the *B.*

melitensis 16M small chromosome corresponds to a pCDS of unknown function. This sequence is located downstream from a predicted operon encoding the MS ring monomer (*FlfF*), three motor proteins (*MotB*, *MotC*, and *MotD*), and two hypothetical proteins and upstream of the *flgE* pCDS encoding the hook monomer (Fig. 1A) (14). The deduced 227-residue polypeptide sequence (25.7 kDa) of *FtcR* is well conserved in other members of the α -subgroup of proteobacteria (Fig. 1B). In *Sinorhizobium meliloti*, *Agrobacterium tumefaciens*, and *Me-*

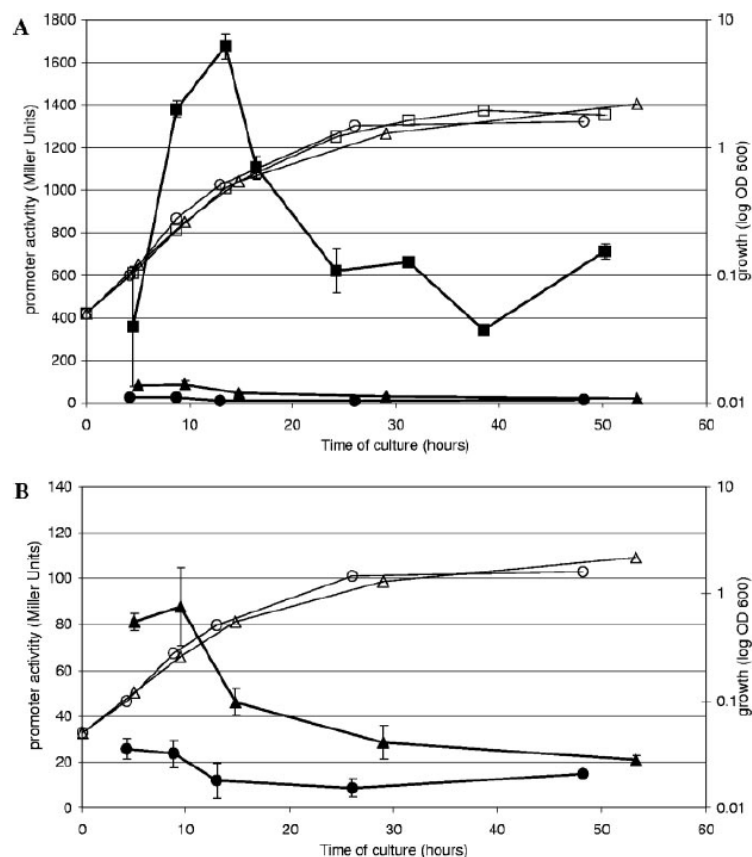


FIG. 2. Activity of the *fliF* promoter region in different *Brucella* strains. (A) Activity of the *fliF* promoter region in the wild-type strain (black squares), the *fliC* mutant strain (black circles), and the *vjbR* mutant strain (black triangles). A *pflif-lacZ* fusion plasmid was transmitted by conjugal transfer into the three strains, each was cultivated in 2YT nutrient broth, and samples were recovered at intervals during bacterial growth to test the *pflif* activity using β -galactosidase assays. The β -galactosidase activity is expressed as the mean \pm standard deviation from three replicates. White squares, circles, and triangles correspond to the optical density at 600 nm for the wild-type strain, the *fliC* mutant, and the *vjbR* mutant, respectively. (B) Same results as those in panel A shown with a larger scale for the abscissa axis to facilitate the distinction between results for the *fliC* and *vjbR* mutants. Only the activity of the *fliF* promoter in the *fliC* mutant strain and the *vjbR* mutant strain are visible.

sorhizobium loti, the corresponding pCDSs exhibit 64%, 62%, and 58% identity with FtcR, respectively, at the amino acid level. The *fliC* genomic context is also conserved in several α -proteobacteria (Fig. 1A). The deduced sequence contains two Pfam domains (PF00486, Trans_reg C; and PF00072, Response reg) which are characteristic of regulators belonging to two-component response regulators (55). This prompted us to rename BMEII0158 "*fliC*" for "flagellar two-component regulator." However, FtcR is atypical because it lacks the aspartate residue usually conserved as a phosphorylation site in the receiver domain (Fig. 1B). Actually, in *Brucella* spp. and in FtcR homologs in *S. meliloti* and *A. tumefaciens*, the aspartate residue is replaced at position 50 by a glutamate residue, while in the FtcR homolog of *M. loti*, it is replaced by an arginine residue. In addition, an inventory of all genes predicted to encode histidine kinases and response regulators in the *B. melitensis* genome did not reveal the presence

of a cognate sensor partner (putative histidine protein kinase) for FtcR (29).

Inactivation of the *fliC* gene downregulates the activity of the flagellar *fliF* promoter region and the production of both the FlgE and FliC flagellar proteins during vegetative growth. In order to test whether FtcR plays a role in the regulation of flagellar gene expression, we generated an *fliC* mutant by integrative disruption as described in Materials and Methods. We knew from a previous study that the noncoding region just upstream of *fliF* (*pflif*), a gene encoding the flagellar MS ring monomer, is transiently active during vegetative growth of the wild-type (WT) *B. melitensis* 16M strain in 2YT medium. In fact, the *pflif* activity is maximal at the very beginning of the exponential growth phase, and concomitantly, there is transient production of the FlgE and FliC proteins, which correspond to monomers of the flagellar hook and filament, respectively (14). To investigate the contribution of FtcR to flagellar

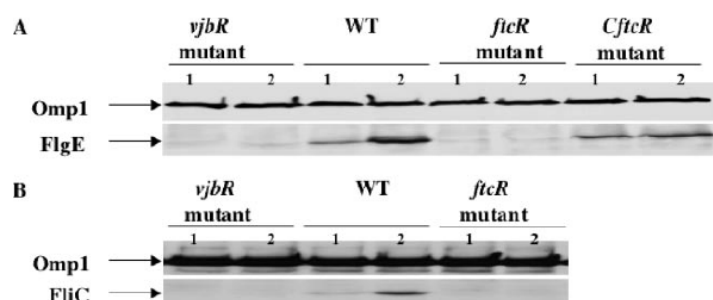


FIG. 3. Western blot of FlgE and FliC expression in the *ftcR* mutant strain, the *vjbR* mutant strain, and the wild-type strain. The strains were cultivated in 2YT nutrient broth, and extracts were prepared from samples harvested at the end of the latent phase of growth (OD_{600} of 0.1) (lanes 1) and at the beginning of the exponential phase of growth (OD_{600} of 0.25) (lanes 2). The extracts were separated by electrophoresis, transferred to nylon membranes, and probed with FlgE-specific (A) or FliC-specific (B) antiserum. A monoclonal anti-Omp1 antibody was used as a loading control. *CftcR*, mutant *ftcR* containing a complementation pMR ϕ *ftcR-ftcR* plasmid.

expression during vegetative growth in rich medium, we used a *pflfF-lacZ* translational fusion (plasmid pBBCmpflfF-lacZ) to measure *pflfF* activity in the *ftcR* mutant compared to that in the WT strain. A 20- to 160-fold reduction of *pflfF* activity was observed, depending on the growth stage of *pflfF* in the mutant strain (Fig. 2A). The same experiment with a Δ *vjbR* mutant strain showed a 5- to 40-fold reduction of *pflfF* activity as previously described (Fig. 2A) (11). In the same way, FlgE and FliC protein levels were analyzed in WT and *ftcR* mutant strains by Western blot analysis. We used a Δ *vjbR* mutant strain harvested at the same time as a negative control of flagellar protein expression (11). The Omp1 protein detected by a monoclonal antibody was used as a loading control (Fig. 3).

A clear increase in the production of the hook and the flagellin proteins can be seen in the WT extracts between the end of the latent phase of growth and the beginning of the exponential phase. However, almost no FlgE or FliC production was detected in either the *ftcR* mutant or the Δ *vjbR* mutant strain (Fig. 3). The expression *in trans* of the *ftcR* pCDS (using the plasmid pMR ϕ *ftcR-ftcR*) in the *ftcR* mutant restores the production of FlgE, indicating that the mutation has no polar effect on downstream genes (Fig. 3A). Taken together, these data show that FtcR is required for the production of at least three flagellar components that are found in distinct locations in the flagellar structure (base, hook, and filament). These results strongly point to FtcR as an important regulatory protein for flagellar gene expression, at least during vegetative growth.

FtcR also regulates the *fliF* promoter region intracellularly. Using a *pflfF-gfp* fusion, it was recently demonstrated that *pflfF* is active during macrophage infection (14). We transferred this *pflfF-gfp* reporter system (pBBpflfF-gfp) by conjugation to the *ftcR* mutant and used this strain to infect a monolayer of bovine macrophages. Postinfection observations at different times contrasted with those for the parent strain, with the *ftcR* mutant failing to exhibit *pflfF* activity (data not shown). This result confirms that FtcR is also a transcriptional activator of *pflfF* *ex vivo*.

The *ftcR* mutant has the same phenotype as structural flagellar mutants in both cellular and murine models of infection. The flagellum of *B. melitensis* is involved in persistence in

a murine model of infection, whereas there was no demonstrable need of this appendage during the course of cellular infection (14). Because FtcR positively regulates the production of at least three flagellar components related to distinct locations at the flagellar structural level (see above), it is probable that the absence of functional FtcR leads to the absence of a flagellar structure. Accordingly, an *ftcR* mutant should be attenuated as much as the strains mutated in genes encoding flagellar structural components. To test this hypothesis, cellular and murine infections were carried out with the *ftcR* mutant (see Materials and Methods). In HeLa cells and bovine macrophages, we observed no attenuation of the *ftcR* mutant compared to that in the WT parental strain (data not shown). In BALB/c mice, the *ftcR* mutant was not attenuated after 1 week of infection but was attenuated after 4 weeks of infection (Table 3). These results are in agreement with data obtained with *Brucella* strains mutated in genes encoding various structural flagellar components (14).

All of the above data strengthen the evidence that FtcR plays a major role in flagellar gene regulation.

FtcR is a direct activator of the *fliF* gene. Like *Brucella*, *Caulobacter crescentus* belongs to the α -subgroup of proteobacteria, but no predicted ortholog of the *ftcR* gene is found in its genome. This fact allowed us to exploit the natural cellular context of *C. crescentus* to study the potential direct transcrip-

TABLE 3. Virulence of *Brucella melitensis* wild-type and flagellar mutant strains in BALB/c mice

<i>Brucella</i> strain	Log CFU/spleen at ^b :			
	1 wk	4 wk	8 wk	12 wk
Wild type	5.61 \pm 1.11	5.41 \pm 0.61	4.20 \pm 0.36	2.55 \pm 0.86
<i>fliF</i> mutant ^a	6.22 \pm 0.60	3.72 \pm 0.39	2.84 \pm 0.36	0.43 \pm 0.65 ^d
<i>ftcR</i> mutant	5.63 \pm 0.79	3.01 \pm 0.19	1.98 \pm 1.10	0.83 ^c

^a Mutant in the gene encoding the basal body and described in reference 14.

^b For each *Brucella* strain, four mice were intraperitoneally inoculated with about 10^4 CFU. Spleens were collected, homogenized, and plated on 2YT agar after 1, 4, 8, or 12 weeks to determine bacterial survival. Data are means \pm standard deviations ($n = 4$).

^c Three out of four mice cleared the bacteria.

^d Two out of four mice cleared the bacteria.

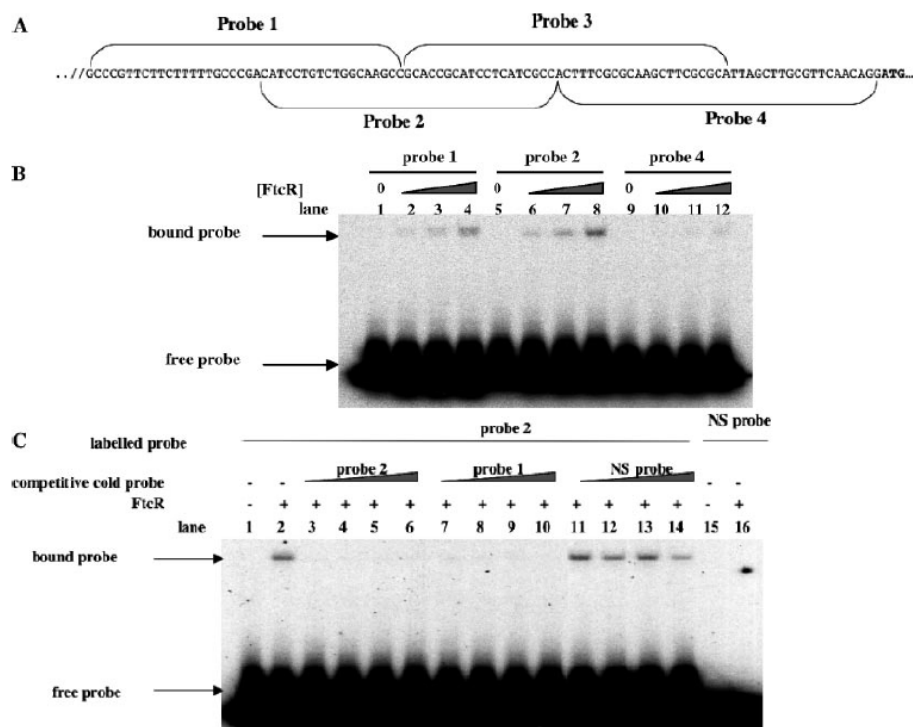


FIG. 4. Analysis of FtcR binding on the *fliF* promoter. (A) Representation of the ~100-nucleotide genomic region containing the *fliF* promoter. The ATG of the *fliF* pCDS is in bold. The four labeled *pflif* fragments used for the EMSA experiments are indicated (probes 1, 2, 3, and 4). //, predicted transcriptional terminator for the preceding *fliC* gene. (B) Binding of FtcR to *pflif*. Four different end-labeled probes corresponding to fragments of the *pflif* genomic region (see panel A) were incubated with increasing quantities of recombinant FtcR for 20 min at room temperature and then subjected to electrophoresis in a nondenaturing polyacrylamide gel. The FtcR quantities used were 0 ng (lanes 1, 5, and 9), 50 ng (lanes 2, 6, and 10), 100 ng (lanes 3, 7, and 11), and 200 ng (lanes 4, 8, and 12) (data for probe 3 not shown). (C) Competitive binding of FtcR to probe 2. End-labeled probe 2 was mixed with unlabeled probe (competitive cold probe) 1 or 2, or a nonspecific (NS) probe and incubated with 200 ng of recombinant FtcR. Samples were then subjected to an electrophoretic mobility shift assay. A competitive cold probe was used in excess of 2.5 ng (lanes 3, 7, and 11), 5 ng (lanes 4, 8, and 12), 15 ng (lanes 5, 9, and 13), and 45 ng (lanes 6, 10, and 14). As controls, labeled probe 2 was tested alone with FtcR (lane 2) or without FtcR (lane 1) and labeled aspecific probe alone was tested with FtcR (lane 15) or without FtcR (lane 16).

tional effect of FtcR on *pflif*, with both partners being imported from *Brucella*.

The strain NA1000 of *C. crescentus* (Table 1) was first conjugated with a plasmid bearing a *pflif-lacZ* fusion (pBBN ρ *pflif-lacZ*) and then with a second plasmid which either had no insert as a negative control (pMR10CmKm) or harbored *ftcR* under the control of a constitutive promoter (pMR ρ *lac-ftcR*). β -Galactosidase assays were performed, and the averages from three independent experiments \pm standard errors were calculated to determine *pflif* activity in the two strains. In the absence of *ftcR* in *trans*, 67.2 ± 3.0 Miller units was obtained. In contrast, 620.9 ± 12.8 Miller units was calculated in the presence of *ftcR*. These data correspond to a ninefold induction of *pflif*, in comparison to what was seen with the negative control, which suggests that FtcR might interact directly with the *fliF* promoter.

This hypothetical interaction was tested using the EMSA technique. In the first instance, increasing amounts of FtcR recombinant protein were mixed with four labeled *pflif* fragments that were 40 bp in length (designated probes 1, 2, 3, and

4). The probes overlap each other by half of their length and altogether cover a genomic region of 100 nucleotides localized between a predicted transcriptional Rho-independent terminator for the preceding *fliC* gene and the beginning of the *fliF* pCDS (Fig. 4A). Following native gel electrophoresis, a shifted DNA band of increasing intensity appeared when probe 1 or 2 was incubated with increasing amounts of the FtcR protein (Fig. 4B). No clear binding was observed using probe 3 (data not shown) or 4 (Fig. 4B). The specificity of the binding assay was evaluated in a second experiment. A nonspecific DNA probe caused no mobility shift and did not, when unlabeled, compete with labeled probe 1 or 2 for FtcR binding. On the contrary, both cold probes 1 and 2 were able to compete with labeled probe 2 (Fig. 4C) and probe 1 (data not shown) for FtcR binding. This indicates that FtcR binds directly and specifically to the *pflif* promoter region.

FtcR mediates the activator effect of VjbR on flagellar genes. VjbR was demonstrated to be the *Brucella* functional counterpart of the *S. meliloti* flagellar master regulator VisR (51), and it is also encoded at the same genetic locus. Notably, the

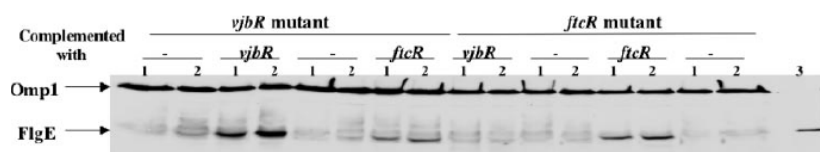


FIG. 5. Expression of FlgE in the *vjbR* and *ficR* mutants containing expression plasmid *vjbR* pBBR-*vjbR* (*vjbR*), expression plasmid FtcR pMRp*ficR*-*ficR* (*ficR*), or the corresponding empty plasmids pBBR1MCS-4 and pMR10CmKm(–). All strains were cultivated in 2YT broth, and whole-cell extracts were recovered for each strain at the end of the latent phase of growth (OD_{600} of 0.1) (lanes 1) and at the beginning of the exponential phase of growth (OD_{600} of 0.25) (lanes 2). Recombinant FlgE was used as a positive control (lane 3). The extracts were separated by electrophoresis, transferred to nylon membranes, and probed with FlgE-specific antiserum. A monoclonal anti-Omp1 antibody was used as a loading control.

expression levels of both *fliF* and *flgE* were strongly reduced in a *vjbR* mutant (11). A similar result for FlcC production was also observed in this study (Fig. 3B). Because this phenotype was globally shared with the *ficR* mutant described here, we wanted to estimate the relative contribution of FtcR and VjbR with respect to flagellar expression.

As demonstrated, in this study *pflfF* activity was almost abolished in both the *vjbR* and the *ficR* mutants compared to that in the WT strain but was two- to fourfold higher in the *vjbR* mutant than in the *ficR* mutant (Fig. 2B). Thus, the absence of FtcR seems to be more deleterious than the absence of VjbR regarding the activation of *pflfF*.

To gain further insight into the respective roles of these two regulators in flagellar expression, we tested the ability of VjbR or FtcR to cross-complement an *ficR* or a *vjbR* mutant, respectively. To achieve this, an expression plasmid of FtcR (pMRp*ficR*-*ficR*) or VjbR (pBBR-*vjbR*) (11) or plasmids without inserts as negative controls (pMR10CmKm and pBBR1MCS-4) were conjugated in the *vjbR* mutant and in the *ficR* mutant. FlgE protein levels were analyzed in the resulting strains by Western blot analysis. Both the *ficR* mutant and the *vjbR* mutant produced little or no detectable FlgE with the plasmids used as negative controls, but both were comple-

mented by the expression in *trans* of the corresponding WT gene (positive control). Importantly, while the expression of *vjbR* in *trans* failed to restore FlgE production in the *ficR* mutant, the expression of *ficR* in *trans* was able to complement the *vjbR* mutant (Fig. 5). This strongly indicates that the absence of flagellar gene expression in the *vjbR* mutant is actually caused by a reduction in the amount of active FtcR.

In this context, VjbR could be an activator of *ficR* gene expression. To test this hypothesis, we used a reporter plasmid (pBBCmp*ficR*-*lacZ*) to compare *pflfF* activity between the *vjbR* mutant and the WT strain of *B. melitensis* 16M along a growth curve. In the WT strain, *pflfF* activity reached a maximum value at the beginning of the exponential phase and then decreased slowly. The same profile was observed in the *vjbR* mutant, but *pflfF* activity was reduced by about half compared to that in the WT strain (Fig. 6). This observation confirms that the expression of *ficR* is affected (twofold) by the loss of VjbR.

DISCUSSION

The present work focused on *B. melitensis*, describing for the first time a transcriptional regulator called FtcR that directly

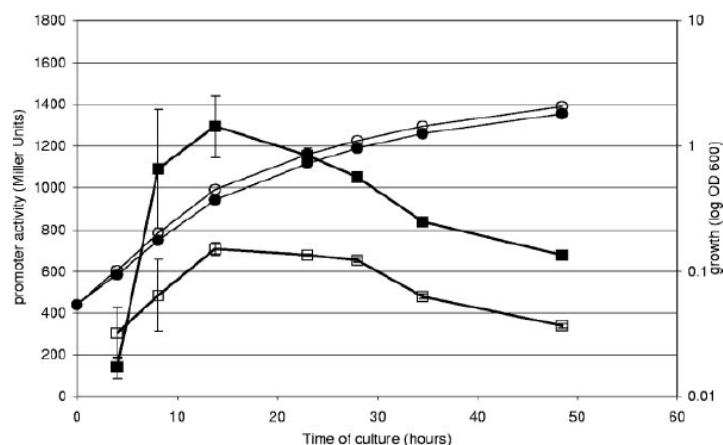


FIG. 6. Activity of the *ficR* promoter in the *vjbR* mutant (white) and in wild-type *B. melitensis* 16M (black). A *pflfF*-*lacZ* fusion plasmid was conjugated into the *vjbR* mutant and into the wild-type strain. Both strains were cultivated in 2YT nutrient broth, and samples were harvested along the growth curve to test *pflfF* activity by β -galactosidase assays. Circles, optical density at 600 nm; squares, β -galactosidase activity expressed as the mean \pm standard deviation from three replicates.

activates flagellar expression. FtcR is conserved in several symbiotic and pathogenic α -proteobacterial *Rhizobiales*. A *B. melitensis* *ftcR* mutant is unable to produce the FlgE and FlhC flagellar proteins and has almost no *pflfF* activity during vegetative growth or during macrophage infection compared to the parental WT strain. Moreover, observations of this mutant by electron microscopy did not reveal any flagellar structures under growth conditions in which the WT strain was flagellated (14; data not shown). In addition, the *ftcR* mutant is not attenuated in cellular infection models but exhibited a marked virulence defect after 4 weeks or more of infection in BALB/c mice. These virulence phenotypes were reminiscent of the phenotypes observed for strains mutated in genes encoding various flagellar components (14). Taken together, these results suggest the total absence of flagella in the *ftcR* mutant and point to FtcR as a key regulator in switching on the expression of flagella in *Brucella*.

This study also shows that FtcR binds directly to the region just upstream of the *fliF* pCDS. This region is localized between the transcriptional Rho-independent terminator for the preceding *fliC* pCDS and the beginning of the *fliF* pCDS and so is predicted as a noncoding region. In addition, cloning this sequence upstream of a reporter gene such as *gfp* or *lacZ* provides an expression profile which is modified in response to *ftcR* or *vjbR* mutation in the same way as other flagellar components. All of this evidence suggests that the *fliF* promoter (*pflfF*) is located in this genomic region between the *fliC* and the *fliF* pCDS. In the EMSA, a clear positive and specific signal was observed for probes 1 and 2 (Fig. 4). No signal was observed with probes 3 and 4, suggesting that the FtcR binding site is located in the 20-nucleotide-sized region common to probes 1 and 2. Additional experiments should be carried out to be able to identify and characterize the FtcR binding sequence relative to the transcriptional start of the *fliF* gene.

It has been noted that in all known flagellar hierarchies, the *fliF* gene is considered to be a class II gene, encoding the monomer for the MS ring formation, which is one of the first steps of a classical flagellar assembly. A hierarchical expression of flagellar genes has not yet been demonstrated in *Brucella*, although this is the most probable situation as demonstrated for all other bacterial flagellar systems (except rare spirochetes [3]) investigated to date. The binding of FtcR to *pflfF*, along with several lines of evidence for the control of flagellar gene expression by this regulator, suggests that FtcR could be considered a flagellar class I master regulator (32, 52).

Analysis of the FtcR-predicted amino acid sequence revealed two domains in the protein: a response regulator receiver domain at the N terminus and a C-terminal transcriptional regulatory domain that classifies FtcR as a response regulator belonging to the two-component system (55). The closest homologs of FtcR (more than 30% identity) found in the NCBI nonredundant database are exclusively from *Rhizobiaceae* and are most often encoded by genes located in flagellar loci as in *Brucella*. A unique feature of the FtcR regulator is the absence of a classical phosphorylation site in the response regulator domain. Interestingly, upon multiple alignment (CLUSTALW) of FtcR and its closest homologs with the well-known response regulators CheY and NtrC, the aspartate (D57 in CheY and D54 in NtrC), which has been shown to be the phosphorylated residue of the active site, aligned with the

glutamate E50 residue of FtcR (45, 56). The replacement of the classical aspartate residue by a glutamate residue is also observed in *A. tumefaciens* and *S. meliloti*. It has to be noted that the molecular structure of glutamate is very similar to that of aspartate, and like aspartate, glutamate is negatively charged. The E50 glutamate residue in FtcR and its homologs could thus mimic constitutive phosphorylation. Indeed, it has been shown for other transcriptional regulators, such as NtrC (25, 37), CtrA (47), OmpR (28), and RcsB (18), that the experimental replacement of aspartate by a glutamate residue in the phosphorylation active site allows these regulators to bypass, at least partially, the requirement for phosphorylation.

Apart from FtcR and its closest homologs, some other rare bacterial regulators have been discovered which lack the conserved aspartate residue in the phosphorylation site. Examples include FleQ of *Pseudomonas aeruginosa* (9) and *Legionella pneumophila* (21), AdnA of *Pseudomonas fluorescens* (2), FlrA of *Vibrio cholerae* and *Vibrio fischeri* (24, 35), and FlaK and LafK of *Vibrio parahaemolyticus* (23, 54). All of these belong to the σ^{54} -dependent response regulator family, and all are at the top of a flagellar hierarchy without known sensor histidine kinase partners. The absence of a sensor histidine kinase encoded in *Brucella* flagellar loci argues in favor of the hypothesis that FtcR does not need phosphorylation to be active. In fact, genes of two-component systems are often coupled in genomes, as demonstrated in a study by Koretke et al. (26). The hypothesis that FtcR is nonphosphorylated and constitutively active raises the question of how the activity of FtcR is modulated. In *P. aeruginosa*, nonphosphorylated FleQ is regulated at the transcriptional level by the Vfr repressor and its activity is repressed posttranslationally upon binding with the FleN antiactivator (8, 9). The first regulator of FtcR activity in *Brucella*, VjbR, was identified in the present study.

The LuxR-type transcriptional regulator VjbR, which also activates the type IV secretion system, caught our attention principally because it was shown to positively control the activity of the *pflfF* promoter (11), FlgE production (11), and FlhC production (this study) in *B. melitensis*. This phenotype, also observed for the *ftcR* mutant, suggests the involvement of FtcR and VjbR in the same flagellar regulatory pathway, making it probable that one of them modulates the expression or the activity of the other to control flagellar expression. In this study, we observed a more attenuated *pflfF* activity in the *ftcR* mutant than in the *vjbR* mutant. In addition, FlgE production was shown to be restored in the *vjbR* mutant when *ftcR* was expressed in *trans* under the control of its own promoter, while the expression in *trans* of *vjbR* did not restore FlgE production in the *ftcR* mutant. These results suggest a more direct regulation of flagellar genes by FtcR. This led us to investigate the influence of VjbR on *pftcR* activity in *Brucella*. While the expression of flagellar genes is almost extinguished in a *vjbR* mutant, the expression of *ftcR* is only twofold reduced. This mild activation of *pftcR* by VjbR could be direct or indirect. In addition, it should also be noted that our data do not exclude a mild activating effect from VjbR directly on *pflfF*, leaving the possibility of a three-gene feed-forward loop motif, including FtcR. This motif has frequently been observed in regulation networks and was defined by Mangan and Alon as a three-gene pattern composed of two input transcription factors, one of which regulates the other and both of which jointly regulate a

target gene (33). That way, a regulation model in which *vjbR* activates *ficR*, which in turn activates *flhF* and other flagellar genes, could be proposed, without excluding the possibility of a more direct VjbR effect on flagellar genes. More experiments will have to be carried to clarify the situation.

Finally, a comparison of *pflfF* and *pflcR* activities, both under the influence of VjbR, reveals a more abrupt decrease of *pflfF* activity along the growth curve (compare Fig. 2A and 6). This observation, in addition to the partial maintenance of *pflcR* activity in a *vjbR* mutant, suggests the existence of yet-to-be-identified regulators acting beside VjbR. Extra efforts will have to be made to gain further insight into the regulation of the flagellar expression in *Brucella*. Flagellar expression is a complex process that must be precisely tied to the intricacies of the bacterial life cycle. The discovery of the key flagellar regulator, FtcR, is a first step in leading to a better understanding of *Brucella* and, by extension, other α -proteobacteria.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank C. Didembourg for technical assistance. We are grateful to the *Brucella* team of the URBM for helpful discussions.

This work was supported by the Commission of the European Communities, contract no. QLK2-CT-1999-00014. V. Haine, S. Léonard, and J. Ferooz hold a specialization grant from the Fonds pour la Formation à la Recherche dans l'Industrie et dans l'Agriculture (FRIA).

ADDENDUM IN PROOF

Rotter et al. recently published the description of the *ficR* homologue in *Sinorhizobium meliloti* (C. Rotter, S. Mühlbacher, D. Salamon, R. Schmitt, and B. Scharf, J. Bacteriol. 188:6932–6942, 2006).

REFERENCES

- Aldridge, P., and K. T. Hughes. 2002. Regulation of flagellar assembly. *Curr. Opin. Microbiol.* 5:160–165.
- Casaz, P., A. Hapfel, J. Keithan, D. L. Read, S. R. Strain, and S. B. Levy. 2001. The *Pseudomonas fluorescens* transcription activator AdnA is required for adhesion and motility. *Microbiology* 147:355–361.
- Charon, N. W., and S. F. Goldstein. 2002. Genetics of motility and chemotaxis of a fascinating group of bacteria: the spirochetes. *Annu. Rev. Genet.* 36:47–73.
- Chilcott, G. S., and K. T. Hughes. 2000. Coupling of flagellar gene expression to flagellar assembly in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and *Escherichia coli*. *Mol. Biol. Rev.* 64:694–708.
- Cloekaert, A., P. de Wergifosse, G. Dubray, and J. N. Limet. 1990. Identification of seven surface-exposed *Brucella* outer membrane proteins by use of monoclonal antibodies: immunogold labeling for electron microscopy and enzyme-linked immunosorbent assay. *Infect. Immun.* 58:3980–3987.
- Cloekaert, A., M. S. Zygmunt, G. Dubray, and J. N. Limet. 1993. Characterization of O-polysaccharide specific monoclonal antibodies derived from mice infected with the rough *Brucella melitensis* strain B115. *J. Gen. Microbiol.* 139:1551–1556.
- Daniels, R., J. Vanderleyden, and J. Michiels. 2004. Quorum sensing and swarming migration in bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 28:261–289.
- Dasgupta, N., E. P. Ferrell, K. J. Kanack, S. E. H. West, and R. Ramphal. 2002. The *fleQ*, the gene encoding the major flagellar regulator of *Pseudomonas aeruginosa*, is σ^{70} dependent and is downregulated by Vfr, a homolog of *Escherichia coli* cyclic AMP receptor protein. *J. Bacteriol.* 184:5240–5250.
- Dasgupta, N., and R. Ramphal. 2001. Interaction of the antiactivator FleN with the transcriptional activator FleQ regulates flagellar number in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 183:6636–6644.
- Dasgupta, N., M. C. Wolfgang, A. L. Goodman, S. K. Arora, J. Jyot, S. Lory, and R. Ramphal. 2003. A four-tiered transcriptional regulatory circuit controls flagellar biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* 50:809–824.
- Delrue, R. M., C. Deschamps, S. Leonard, C. Nijskens, I. Danese, J. M. Schaus, S. Bonnot, J. Ferooz, A. Tibor, X. De Bolle, and J. J. Letesson. 2005. A quorum-sensing regulator controls expression of both the type IV secretion system and the flagellar apparatus of *Brucella melitensis*. *Cell. Microbiol.* 7:1151–1161.
- Delrue, R. M., M. Martinez-Lorenzo, P. Lestrade, I. Danese, V. Bielaz, P. Mertens, X. De Bolle, A. Tibor, J. P. Gorvel, and J. J. Letesson. 2001. Identification of *Brucella* spp. genes involved in intracellular trafficking. *Cell. Microbiol.* 3:487–497.
- Evinger, M., and N. Agabian. 1977. Envelope-associated nucleoid from *Caulobacter crescentus* stalked and swarmer cells. *J. Bacteriol.* 132:294–301.
- Fretin, D., A. Fauconnier, S. Kohler, S. Halling, S. Leonard, C. Nijskens, J. Ferooz, P. Lestrade, R. M. Delrue, I. Danese, J. Vandenhaute, A. Tibor, X. DeBolle, and J. J. Letesson. 2005. The sheathed flagellum of *Brucella melitensis* is involved in persistence in a murine model of infection. *Cell. Microbiol.* 7:687–698.
- Galibert, F., T. M. Finan, S. R. Long, A. Puhler, P. Abola, F. Ampe, F. Barloy-Hubler, M. J. Barnett, A. Becker, P. Boistard, G. Bothe, M. Boutry, L. Bowser, J. Buhrmester, E. Cadieu, D. Capela, P. Chain, A. Cowie, R. W. Davis, S. Dreano, N. A. Federspiel, R. F. Fisher, S. Gloux, T. Godrie, A. Goffeau, B. Golding, J. Gouzy, M. Gurjal, I. Hernandez-Lucas, A. Hong, L. Huizar, R. W. Hyman, T. Jones, D. Kahn, M. L. Kahn, S. Kalman, D. H. Keating, E. Kiss, C. Komp, V. Lelaure, D. Masuy, C. Palm, M. C. Peck, T. M. Pohl, D. Portetelle, B. Purnelle, U. Ramsperger, R. Surzycki, P. Thebault, M. Vandenbol, F. J. Vorholter, S. Weidner, D. H. Wells, K. Wong, K. C. Yeh, and J. Batut. 2001. The composite genome of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Science* 293:668–672.
- Ghelardi, E., F. Celandroni, S. Salvetti, D. J. Beecher, M. Gominet, D. Lereclus, A. C. Wong, and S. Senesi. 2002. Requirement of *flhA* for swarming differentiation, flagellin export, and secretion of virulence-associated proteins in *Bacillus thuringiensis*. *J. Bacteriol.* 184:6424–6433.
- Gophna, U., E. Z. Ron, and D. Graur. 2003. Bacterial type III secretion systems are ancient and evolved by multiple horizontal-transfer events. *Gene* 312:151–163.
- Gupte, G., C. Woodward, and V. Stout. 1997. Isolation and characterization of *rcsB* mutations that affect colanic acid capsule synthesis in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 179:4328–4335.
- Haine, V., A. Sinon, F. Van Steen, S. Rousseau, M. Dozot, P. Lestrade, C. Lambert, J. J. Letesson, and X. De Bolle. 2005. Systematic targeted mutagenesis of *Brucella melitensis* 16M reveals a major role for GntR regulators in the control of virulence. *Infect. Immun.* 73:5578–5586.
- Harshey, R. M. 2003. Bacterial motility on a surface: many ways to a common goal. *Annu. Rev. Microbiol.* 57:249–273.
- Jacobi, S., R. Schade, and K. Heuner. 2004. Characterization of the alternative sigma factor σ^{54} and the transcriptional regulator FleQ of *Legionella pneumophila*, which are both involved in the regulation cascade of flagellar gene expression. *J. Bacteriol.* 186:2540–2547.
- Jeon, B., K. Itoh, N. Misawa, and S. Ryu. 2003. Effects of quorum sensing on *flaA* transcription and autoagglutination in *Campylobacter jejuni*. *Microbiol. Immunol.* 47:833–839.
- Kim, Y. K., and L. L. McCarter. 2000. Analysis of the polar flagellar gene system of *Vibrio parahaemolyticus*. *J. Bacteriol.* 182:3693–3704.
- Klose, K. E., and J. J. Mekalanos. 1998. Distinct roles of an alternative sigma factor during both free-swimming and colonizing phases of the *Vibrio cholerae* pathogenic cycle. *Mol. Microbiol.* 28:501–520.
- Klose, K. E., D. S. Weiss, and S. Kustu. 1993. Glutamate at the site of phosphorylation of nitrogen-regulatory protein NTRC mimics aspartyl-phosphate and activates the protein. *J. Mol. Biol.* 232:67–78.
- Koretke, K. K., A. N. Lupas, P. V. Warren, M. Rosenberg, and J. R. Brown. 2000. Evolution of two-component signal transduction. *Mol. Biol. Evol.* 17:1956–1970.
- Kovach, M. E., R. W. Phillips, P. H. Elzer, R. M. Roop II, and K. M. Peterson. 1994. pBBR1MCS: a broad-host-range cloning vector. *BioTechniques* 16:800–802.
- Lan, C. Y., and M. M. Igo. 1998. Differential expression of the OmpF and OmpC porin proteins in *Escherichia coli* K-12 depends upon the level of active OmpR. *J. Bacteriol.* 180:171–174.
- Letesson, J. J., and X. De Bolle. 2004. *Brucella* virulence: a matter of control, p. 117–158. In I. Lopez-Goni and I. Moriyon (ed.), *Brucella: molecular and cellular biology*. Horizon Bioscience, Norfolk, United Kingdom.
- Lupp, C., and E. G. Ruby. 2005. *Vibrio fischeri* uses two quorum-sensing systems for the regulation of early and late colonization factors. *J. Bacteriol.* 187:3620–3629.
- Macnab, R. M. 1996. Flagella and motility, p. 123–145. In F. C. Neidhardt et al. (ed.), *Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology*, vol. 1. ASM Press, Washington, D.C.
- Macnab, R. M. 2003. How bacteria assemble flagella. *Annu. Rev. Microbiol.* 57:77–100.
- Mangan, S., and U. Alon. 2003. Structure and function of the feed-forward loop network motif. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:11980–11985.
- Miller, J. H. 1972. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Millikan, D. S., and E. G. Ruby. 2003. FlrA, a σ^{54} -dependent transcriptional activator in *Vibrio fischeri*, is required for motility and symbiotic light-organ colonization. *J. Bacteriol.* 185:3547–3557.
- Moen, S., and J. Vanderleyden. 1996. Functions of bacterial flagella. *Crit. Rev. Microbiol.* 22:67–100.
- Moore, J. B., S. P. Shian, and L. J. Reitzer. 1993. Alterations of highly

- conserved residues in the regulatory domain of nitrogen regulator I (NtrC) of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 175:2692–2701.
38. Muir, R. E., and J. W. Gober. 2004. Regulation of FlbD activity by flagellum assembly is accomplished through direct interaction with the trans-acting factor, FlhX. *Mol. Microbiol.* 54:715–730.
 39. Nguyen, L., I. T. Paulsen, J. Tchien, C. J. Hueck, and M. H. Saier, Jr. 2000. Phylogenetic analyses of the constituents of type III protein secretion systems. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 2:125–144.
 40. Poindexter, J. S. 1964. Biological properties and classification of the *Caulobacter* group. *Bacteriol. Rev.* 28:231–295.
 41. Prouty, M. G., N. E. Correa, and K. E. Klose. 2001. The novel sigma54- and sigma28-dependent flagellar gene transcription hierarchy of *Vibrio cholerae*. *Mol. Microbiol.* 39:1595–1609.
 42. Ramos, H. C., M. Rumbo, and J. C. Sirard. 2004. Bacterial flagellins: mediators of pathogenicity and host immune responses in mucosa. *Trends Microbiol.* 12:509–517.
 43. Robertson, G. T., M. E. Kovach, C. A. Allen, T. A. Ficht, and R. M. Roop II. 2000. The *Brucella abortus* Lon functions as a generalized stress response protease and is required for wild-type virulence in BALB/c mice. *Mol. Microbiol.* 35:577–588.
 44. Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
 45. Sanders, D. A., B. L. Gillece-Castro, A. M. Stock, A. L. Burlingame, and D. E. Koshland, Jr. 1989. Identification of the site of phosphorylation of the chemotaxis response regulator protein, CheY. *J. Biol. Chem.* 264:21770–21778.
 46. Shapiro, L. 1995. The bacterial flagellum: from genetic network to complex architecture. *Cell* 80:525–527.
 47. Siam, R., and G. T. Marczyński. 2003. Glutamate at the phosphorylation site of response regulator CtrA provides essential activities without increasing DNA binding. *Nucleic Acids Res.* 31:1775–1779.
 48. Simon, R., U. Priefer, and A. Pühler. 1983. A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in gram-negative bacteria. *Bio/Technology* 1:784–791.
 49. Skerker, J. M., and M. T. Laub. 2004. Cell-cycle progression and the generation of asymmetry in *Caulobacter crescentus*. *Nat. Rev. Microbiol.* 2:325–337.
 50. Song, Y. C., S. Jin, H. Louie, D. Ng, R. Lau, Y. Zhang, R. Weerasekera, S. Al Rashid, L. A. Ward, S. D. Der, and V. L. Chan. 2004. FlaC, a protein of *Campylobacter jejuni* TGH9011 (ATCC43431) secreted through the flagellar apparatus, binds epithelial cells and influences cell invasion. *Mol. Microbiol.* 53:541–553.
 51. Sourjik, V., P. Muschler, B. Scharf, and R. Schmitt. 2000. VisN and VisR are global regulators of chemotaxis, flagellar, and motility genes in *Sinorhizobium* (*Rhizobium*) *meliloti*. *J. Bacteriol.* 182:782–788.
 52. Soutourina, O. A., and P. N. Bertin. 2003. Regulation cascade of flagellar expression in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 27:505–523.
 53. Sperandio, V., A. G. Torres, and J. B. Kaper. 2002. Quorum sensing *Escherichia coli* regulators B and C (QseBC): a novel two-component regulatory system involved in the regulation of flagella and motility by quorum sensing in *E. coli*. *Mol. Microbiol.* 43:809–821.
 54. Stewart, B. J., and L. L. McCarter. 2003. Lateral flagellar gene system of *Vibrio parahaemolyticus*. *J. Bacteriol.* 185:4508–4518.
 55. Stock, A. M., V. L. Robinson, and P. N. Goudreau. 2000. Two-component signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* 69:183–215.
 56. Weiss, V., and B. Magasanik. 1988. Phosphorylation of nitrogen regulator I (NRI) of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:8919–8923.
 57. Young, G. M., D. H. Schmiel, and V. L. Miller. 1999. A new pathway for the secretion of virulence factors by bacteria: the flagellar export apparatus functions as a protein-secretion system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:6456–6461.

PARTIE X

REMERCIEMENTS

X REMERCIEMENTS

Je remercie :

Le Professeur Jean-Jacques Letesson pour avoir accepté d'être le promoteur de cette thèse.

Le Docteur Pierre Cornelis, le Professeur Jean-Yves Matroule, le Professeur Carine Michiels et le Docteur Michel Zygmunt pour avoir accepté d'être membre de ce jury de thèse.

Le Professeur Jean Vandenhoute pour sa confiance et les nombreuses discussions scientifiques.

Le Professeur Xavier DeBolle pour son aide à de multiples reprises.

Le Docteur David Fretin et le CERVA pour avoir effectué les infections murines.

Julien Lemaire pour avoir effectué les expériences de « Real-Time PCR ».

Le service de microscopie électronique des FUNDP pour son aide technique.

Le FRIA pour avoir financé cette thèse d'octobre 2004 à octobre 2007.

Le FNRS pour m'avoir permis de financer une partie du voyage vers le congrès BLAST de Laughlin aux USA du 14 au 19 Janvier 2007.

La bourse "Fonds Adrien Bauchau" pour avoir financé une partie du voyage vers le 12^{ème} congrès « Japan Flagellar Meeting » à Hiroshima.

Le Professeur Shin-Ichi Aizawa et son équipe pour m'avoir invité en tant qu'orateur au « Japan Flagellar Meeting » d'Hiroshima au Japon du 5 au 7 mars 2007.

Le Professeur Makoto Myata et son équipe pour m'avoir invité à présenter mes recherches dans son laboratoire de l'Université d'Osaka City au Japon.

Le Docteur Tsuyoshi Kenri pour m'avoir présenté la communauté scientifique japonnaise et m'avoir hébergé à Tokyo.

Le Professeur Keiichi Namba et son équipe, et le Docteur Fadel Samatey pour leur accueil et la visite de leur laboratoire dans le « Graduate School of Frontier Biosciences » de l'université d'Osaka.

Bettina Battisti pour la relecture et les corrections orthographiques de cette thèse.

Toutes les autres personnes non mentionnées par manque de place et qui ont contribué à un moment ou à un autre à la réalisation de cette thèse.

